

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-503455

第3部門第2区分

(43) 公表日 平成7年(1995)4月13日

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I
A 6 1 K 35/12	A D U	7431-4C	
31/70		9454-4C	
48/00		8314-4C	
		8314-4C	A 6 1 K 37/ 02
		8314-4C	37/ 66

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-507903
 (86) (22) 出願日 平成4年(1992)10月23日
 (85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)4月25日
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 2 / 0 8 9 9 9
 (87) 国際公開番号 W O 9 3 / 0 7 9 0 6
 (87) 国際公開日 平成5年(1993)4月29日
 (31) 優先権主張番号 7 8 1, 3 5 6
 (32) 優先日 1991年10月25日
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)
 (31) 優先権主張番号 8 6 3, 6 4 1
 (32) 優先日 1992年4月3日
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 サン ディエゴ リージョナル キャンサー センター
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 92121,
 サン ディエゴ, スイート 200, サイエ
 ンス パーク ロード 3099
 (72) 発明者 ソボル, ロバート イー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037,
 ラ ホヤ, ラ ホヤ ハーモサ アベニュー 5673
 (72) 発明者 ゲイジ, フレッド エイチ.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037,
 ラ ホヤ, カミニート ヘレーチョ 8388
 (74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌のリンホカイン遺伝子療法

(57) 【要約】

腫瘍の免疫療法の新規な方法を記載する。この免疫療法は、サイトカイン遺伝子産物の分泌を引き起こし、腫瘍性抗原に対する被験体の免疫応答を刺激する細胞の遺伝的改変を包含する。1つの実施態様では、少なくとも1種のサイトカイン遺伝子産物を分泌するように遺伝的に改変された自己の線維芽細胞を、活性腫瘍部位以外の部位において、腫瘍性抗原を伴う製剤形態で被験体を免疫処置するために使用する。別の実施態様では、少なくとも1種の腫瘍性抗原生産物を発現し、そして少なくとも1種のサイトカイン遺伝子産物を分泌するように遺伝的に改変された細胞を、活性腫瘍部位以外の部位において、被験体を免疫処置する製剤形態で使用する。

請求の範囲

1. 被験体の癌を処置する方法であって、腫瘍性抗原、および、少なくとも1種のサイトカイン遺伝子産物を発現するように遺伝的に改変されたCE細胞を含有する製剤形態で、活性腫瘍部位以外の部位において、該被験体を免疫処置することにより、癌に対する該被験体の免疫応答を刺激する工程を包含する、方法。
2. 前記被験体からあらかじめ単離された腫瘍細胞が、前記腫瘍性抗原を提供する、請求項1に記載の方法。
3. 前記サイトカイン遺伝子が、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-3、インターロイキン-4、インターロイキン-5、インターロイキン-6、およびガンマインターフェロンからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。
4. 1種のサイトカイン遺伝子が、インターロイキン-2である、請求項3に記載の方法。
5. CE細胞を生産するために、少なくとも1種のサイトカイン遺伝子が組換え法により細胞中に転移される、請求項1に記載の方法。
6. 前記サイトカイン遺伝子が、発現ベクター中に存在する、請求項5に記載の方法。
7. 前記発現ベクターが、自殺遺伝子をさらに含有する、請求項6に記載の方法。

およびガンマインターフェロンからなる群から選択される、請求項11に記載の組成物。

12. 1種のサイトカイン遺伝子が、インターロイキン-2である、請求項12に記載の組成物。
14. 各サイトカイン遺伝子が、免疫応答を刺激するのに十分であるが、実質的な全身的毒性を避けるのに十分低いレベルで発現される、請求項11に記載の組成物。
15. 前記形質導入の工程において、前記レトロウイルス発現ベクターが、IL-2の持続分泌を引き起こすプロモーターを有する、請求項9に記載の方法。
16. 前記レトロウイルス発現ベクターが、10日またはそれ以上の期間、少なくとも4単位/日のIL-2の分泌を引き起こす、請求項15に記載の方法。

8. 前記CE細胞が、線維芽細胞および抗原提示細胞から生成される、請求項8に記載の方法。
9. 癌に対する被験体の免疫応答を高める方法であって：
 - a) 該被験体から線維芽細胞を単離する工程；
 - b) インビトロで、該線維芽細胞を培養する工程；
 - c) レトロウイルス発現ベクター中に、IL-2をコードする遺伝子および腫瘍性抗原をコードする遺伝子を含有するレトロウイルス発現ベクターを用いて、該線維芽細胞を形質導入して、該線維芽細胞により、該腫瘍性抗原を発現し、そして、該IL-2を発現および分泌する工程；および
 - d) 活性腫瘍部位以外の部位において、免疫応答を高めるのに十分であるが、実質的な全身的毒性を避けるのに十分に低いレベルでIL-2を発現し、そして該腫瘍性抗原を発現する該線維芽細胞を用いて、該被験体を免疫処置する工程、を包含する、方法。
10. 前記線維芽細胞が、自殺遺伝子を発現するように、さらに改変される、請求項9に記載の方法。
11. 腫瘍性抗原に対する被験体の免疫応答を高める組成物であって、該組成物が、腫瘍性抗原、および、少なくとも1種のサイトカイン遺伝子産物を発現するように遺伝的に改変されたCE細胞を含有する、組成物。
12. 前記サイトカイン遺伝子が、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-3、インターロイキン-4、インターロイキン-5、インターロイキン-6、

明 細 書

癌のリンホカイン遺伝子療法

背景

本出願は、1991年5月25日に出願された米国特許出願第07/720,872号の一部継続出願である1991年10月25日に出願された米国特許出願第07/781,355号の一部継続出願である。両出願とも本明細書中に、全体が援用されている。

免疫系の生物学の我々の理解における近年の進歩は、サイトカイン(1-3)と呼ばれる免疫応答の重要なモジュレーターを同定するに至った。リンパ球により産生される免疫系モジュレーターが、リンホカインと名付けられており、サイトカインのサブセットのことである。これらの薬剤は、抗腫瘍性免疫に関与する多くの免疫応答を媒介する。数種のこれらのサイトカインが、組換えDNA法により生産され、それらの抗腫瘍効果について評価されてきた。リンホカインおよび関連する免疫モジュレーターの投与は、種々の新生物を伴う被験体に、目的の腫瘍応答を引き起こす(4-7)。しかしながら、現在の様式でのサイトカイン投与は、これらの薬剤の治療上の価値を限定する毒性をしばしば伴う。

例えば、インターロイキン-2(IL-2)は、抗腫瘍性免疫の獲得において重要なリンホカインである(4)。腫瘍性抗原に対する応答で、ヘルパーT細胞と名付けられるリンパ球のサブセットが、少量のIL-2を分泌する。このIL-2は、腫瘍性抗原刺激部位で局所的に作用して、全身的な腫瘍細胞破壊を媒介

する細胞障害性T細胞およびナチュラルキラー細胞を活性化させる。IL-2の静脈内、リンパ管内および病巣内投与は、数名の患者に臨床的に重大な応答を引き起こした(4-6)。しかしながら、激しい毒性(低血圧およびアデノマ(adema))により、静脈内およびリンパ管内IL-2投与の投与量および効能が制限される(5-7)。全身的に投与されたリンホカインの毒性は、これらの薬剤が局所的な細胞の相互作用を媒介し、そして通常非常に少量しか分泌されないもので驚くべきものではない。

さらに、インターロイキン-4(IL-4)、アルファインターフェロン(α -INF)およびガンマインターフェロン(γ -INF)のような他のサイトカインが、腫瘍細胞に対する免疫応答を刺激するために使用されてきた。IL-2と同様に、現在の様式での投与は、不利な副作用を有する。

全身的サイトカイン投与の毒性を回避するために、幾人かの研究者が、IL-2の病巣内注入を研究した。このアプローチは、全身的IL-2投与に関係する毒性を排除する(8,9,10)。しかしながら、多数回の病巣内注入には、治療効能を最適化することが要求される(9,10)。従って、多くの被験体に対して、特に、死亡する可能性を伴わずに注入が腫瘍部位に到達できない場合、これらの注入は実用的でない。

代替的なアプローチは、腫瘍細胞中へのサイトカイン遺伝子の転移を包含し、数種の動物腫瘍モデルで重大な抗腫瘍性免疫応答を引き起こした(11-14)。これらの研究では、同系の宿主に移植された場合、サイトカイン遺伝子の腫瘍細胞中へ

の転移に続くサイトカイン遺伝子産物の発現は、サイトカイン分泌腫瘍細胞の腫瘍形成性を停止させた。IL-2(11,13)、 γ -IRP(13)またはインターロイキン-4(IL-4)(14)に対する遺伝子の転移は、いくつかの異なる組織学的タイプのネズミの腫瘍の成長を、顕著に減少させたかまたは排除した。IL-2遺伝子転移を用いる研究において、処置された動物はまた、全身的な抗腫瘍性免疫を獲得し、改変されていない親腫瘍による以後の腫瘍性の攻撃に対して保護された(11,13)。非改変親腫瘍細胞と、IL-2遺伝子を発現するように設計された遺伝的に改変された腫瘍細胞との混合を用いて、免疫処置を行い腫瘍成長の類似の阻害および防御免疫もまた証明された。これらの動物腫瘍の研究では、局所的なリンホカインの転移遺伝子の発現に関係する毒性は、全く報告されていない(11-14)。

上記の遺伝子転移処理は、抗腫瘍性免疫を提供することが示されたが、未だ実用上の困難を有している。ほとんどの被験体の腫瘍がインビトロでの増殖のために樹立されておらず、ヒトのインビボでの遺伝子転移の方法も使用され得ないので、機能を有するサイトカイン遺伝子を、多数の被験体の腫瘍細胞中に転移できないことにより、このアプローチは制限される。

発明の要旨

本発明は、新規で、より実用的なサイトカインの癌免疫治療の方法を示す。あるアプローチでは、例えば、日常的な皮

膚バイオプシーから得られる繊維芽細胞のような被験体由来の選択された細胞が、遺伝的に改変されて、1種またはそれ以上のサイトカインを発現する。または、マクロファージ、単球およびリンパ球のような、通常は免疫系において抗原提示細胞として働く被験体の細胞もまた、1種またはそれ以上のサイトカインを発現するように遺伝的に改変され得る。以後、これらの改変細胞を、サイトカイン発現細胞、またはCE細胞と呼ぶ。次いで、このCE細胞を、例えば、照射腫瘍細胞の形態で、または精製された天然または組換え腫瘍性抗原の形態で、被験体の腫瘍性抗原と混合し、例えば皮下法のような、免疫処置において使用して、全身的な抗腫瘍性免疫を誘発する。

サイトカインは、活性腫瘍部位以外の部位での局所的な免疫処置により、全身的な抗腫瘍性免疫応答を誘発しまたは高めるのに十分なレベルで、局所的に発現される。サイトカイン投与に関係する全身的な毒性は、起こらない。なぜなら、CE細胞により分泌されるサイトカインのレベルは、全身的なサイトカイン濃度に大きく影響しないからである。

CE細胞により分泌されるサイトカインの量は、抗腫瘍性免疫を誘発するには十分であるが、実質的な全身的毒性を生じさせるよりもずっと少ないので、このアプローチは、局所的なサイトカイン投与という長所を提供する。さらに、この新規な方法は、死亡をまねき得る病巣内注入の必要性を除く。さらに、免疫処置の部位でのサイトカインの連続的な局所的

発現もまた、断続的なサイトカイン注入と比較して、抗腫瘍性免疫応答を高め得る。この方法はまた、わずらわしい静脈内注入と対照的に、CE細胞を用いる局所的な免疫処置という長所を提供する。この方法はまた、インビトロで腫瘍細胞系を樹立する必要性、および遺伝子をこれらの腫瘍細胞に転移する必要性を排除する。

本発明はまた、サイトカインの局所的な発現の代替法をも提供し、サイトカインおよび腫瘍性抗原の両方の細胞発現の遺伝的改変を介して、被験体の腫瘍に対する免疫応答を誘発しおよび/または高める。本実施態様では、被験体由来の選択された細胞は、単離され、そして、サイトカイン遺伝子、および腫瘍性抗原をコードする遺伝子を用いて形質導入される。形質導入細胞を、「キャリアー細胞」と呼ぶ。キャリアー細胞は、繊維芽細胞、および通常は、マクロファージ、単球およびリンパ球のような免疫系で抗原提示細胞として働く細胞を包含し得る。サイトカインおよび腫瘍性抗原の両方を発現している形質導入細胞が、選択され、活性腫瘍部位以外の部位での局所的な免疫処置において使用されて、抗腫瘍性免疫応答を誘発する。CE細胞と共に用いた場合と同様に、キャリアー細胞により分泌されるサイトカインのレベルが、全身的なサイトカイン濃度に有意に影響を与えないので、これらのキャリアー細胞は実質上の全身的な毒性を生じない。この代替法となる実施態様は、時に困難である腫瘍のサンプルの入手の必要を省くため有利である。しかしながら、キャ

リアー細胞は、局所的な免疫処置において、腫瘍細胞、腫瘍細胞ホモジェネート、精製腫瘍性抗原、または組換え腫瘍性抗原と共に使用され得、これによって抗腫瘍性免疫が高められる。

さらに、この第2の実施態様は、第1の実施態様と同じ長所を有し、その長所とは、キャリア細胞により放出されたサイトカインのレベルが、抗腫瘍性免疫を誘発するには十分であるが、實質上の全身的な毒性を生じさせるよりはずっと低いことである。さらに、第1の実施態様と同様に、この方法は、病巣内注入の必要性を省き、サイトカインを連続的に発現させる。この方法はまた、腫瘍細胞のインビトロでの連続培養を樹立する必要性、およびこれらの腫瘍細胞中へ遺伝子を転移する必要性を排除し、そしてわずらわしく長い静脈内注入とは対照的に、キャリア細胞を用いる局所的な免疫処置という長所を提供する。

これらのアプローチはまた、医療業務の他の分野において、臨床的に重要な他の抗原に対する免疫応答を誘発または高める用途を見出し得る。

図面の簡単な説明

図1は、レトロウイルスベクターDC/TXIL2、LXSN-IL2、およびLNCX-IL2の模式図を示す。

図2は、ELISAで測定された3回血清サンプルのIL-2平均濃度を示す。血清は、約 1.5×10^6 個の半無密的な線維芽細胞の

1晩培養から採取した。

図3は、形質導入線維芽細胞により分泌されたIL-2の生物学的活性を示す。これは、血清の3回サンプルと共にインキュベートされたIL-2依存T細胞系への ^3H -TdRの平均取り込み量を測定することで実証された。血清は、約 1.1×10^6 個の半無密的な線維芽細胞の1晩培養から採取された。

図4は、以下の動物間の比較を示す： 10^5 個のCT26腫瘍細胞のみを注入された動物(□)； 10^5 個のCT26腫瘍細胞および 2×10^6 個の改変されていないBALB/C線維芽細胞を注入した動物(■)； 10^5 個のCT26腫瘍細胞および 2×10^6 個のIL-2形質導入BALB/C線維芽細胞を注入した動物(●)； 10^5 個のCT26腫瘍細胞および 1×10^6 個の形質導入BALB/C線維芽細胞を注入した動物(○)。腫瘍の測定値は、各処置群における4匹の動物の腫瘍の横断直径の平均値である。(●)は、腫瘍の成長曲線の統計学的に有意な差異($P < 0.05$)を示す。

図5は、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼのDNA配列のPCR分析を示す。レーン1 - 陽性コントロールpLXSN-21-IL2。レーン2から4は、ゲノムDNAをテストする；レーン5および6、卵巣のゲノムDNA；レーン7、陰性コントロール、DNAなし。肝臓、脾臓、および肺のゲノムDNAを用いても同一の結果が得られた(データは示していない)。

図6は、腫瘍の定着および発達に対するIL-2改変線維芽細胞の効果を示す。ここでは、 5×10^4 個のCT26腫瘍細胞と 2×10^6 個の線維芽細胞とを混合して用い、腫瘍の成長速度に注目した。

した。

図7は、腫瘍の定着および発達に対するIL-2改変線維芽細胞の効果を示す。ここでは、 5×10^4 個のCT26腫瘍細胞と 2×10^6 個の線維芽細胞とを混合して用い、各処置群での動物個体に対する腫瘍の発現時間に注目した。

図8は、腫瘍の定着および発達に対するIL-2改変線維芽細胞の効果を示す。ここでは、 1×10^5 個のCT26腫瘍細胞と 2×10^6 個の線維芽細胞とを混合して用い、腫瘍の成長速度に注目した。

図9は、腫瘍の定着および発達に対するIL-2改変線維芽細胞の効果を示す。ここでは、 1×10^5 個のCT26腫瘍細胞と 2×10^6 個の線維芽細胞とを混合して用い、各処置群での動物個体に対する腫瘍の発現時間に注目した。

図10は、腫瘍の定着および発達に対するIL-2改変細胞の効果を示す。ここでは、 1×10^5 個の改変されていないCT26と 2×10^6 個のDCTK-IL2改変CT-26腫瘍細胞とを混合して用い、 1×10^5 個のCT26と混合した 2×10^6 個のDCTK-IL2改変線維芽細胞と比較し、腫瘍の成長速度に注目した。

図11は、腫瘍の定着および発達に対するIL-2改変細胞の効果を示す。ここでは、 1×10^5 個の改変されていないCT26と 2×10^6 個のDCTK-IL2改変CT-26腫瘍細胞とを混合して用い、 1×10^5 個のCT26と混合した 2×10^6 個のDCTK-IL2改変線維芽細胞と比較し、各処置群での動物個体に対する腫瘍の発現時間に注目した。

図12は、全身的な抗腫瘍性免疫の誘発および腫瘍の成長速度に対するIL-2改変線維芽細胞の効果を示す。マウスは、 5×10^4 個の新鮮な腫瘍細胞を投与する7日前に、 2.5×10^5 個の照射CT26腫瘍細胞と混合した 2×10^6 個の線維芽細胞を用いて免疫処置した。

図13は、全身的な抗腫瘍性免疫の誘発および各処置群での動物個体に対する腫瘍の発現時間に対するIL-2改変線維芽細胞の効果を示す。マウスは、 5×10^4 個の新鮮な腫瘍細胞を投与する7日前に、 2.5×10^5 個の照射CT26腫瘍細胞と混合した 2×10^6 個の線維芽細胞を用いて免疫処置した。

図14は、全身的な抗腫瘍性免疫の誘発および腫瘍の成長速度に対するIL-2改変線維芽細胞の効果を示す。マウスは、 5×10^4 個の新鮮な腫瘍細胞を投与する14日前に、 2.5×10^5 個の照射CT26腫瘍細胞と混合した 2×10^6 個の線維芽細胞を用いて免疫処置した。

図15は、全身的な抗腫瘍性免疫の誘発および各処置群での動物個体に対する腫瘍の発現時間に対するIL-2改変線維芽細胞の効果を示す。マウスは、 5×10^4 個の新鮮な腫瘍細胞を投与する14日前に、 2.5×10^5 個の照射CT26腫瘍細胞と混合した 2×10^6 個の線維芽細胞を用いて免疫処置した。

詳細な説明

腫瘍免疫療法の新規な方法は、サイトカイン遺伝子産物の分泌を引き起こし、腫瘍性抗原に対する被験体の免疫応答を

刺激する細胞の遺伝的改変を包含すると記載される。本明細書中で、「遺伝子」は、所望のタンパク質をコードするヌクレオチド配列であると定義される。ある実施態様では、少なくとも1種のサイトカイン遺伝子産物を分泌するように遺伝的に改変された自己の繊維芽細胞を、活性腫瘍部位以外の部位において、被験体を免疫処置するために、腫瘍性抗原を含む複製形態で使用する。他の実施態様では、少なくとも1種の腫瘍性抗原遺伝子産物を発現し、そして少なくとも1種のサイトカイン遺伝子産物を分泌するように遺伝的に改変された細胞を、活性腫瘍部位以外の部位において、被験体を免疫処置するために複製形態で使用する。好適には、サイトカインは、これらのタンパク質を周囲の環境に効果的に分泌する細胞において発現される。繊維芽細胞は、このような細胞の例である。繊維芽細胞および他の細胞は、本明細書中に後に記載のように、遺伝的に改変され得、1種またはそれ以上のサイトカインを発現し分泌する。

腫瘍性抗原は、以下を包含するいくつかの方法で提供され得るが、それらに限定されない：1)CE細胞に、腫瘍性抗原をコードする遺伝子で、形質導入し得る。次いで、これらの「キャリアー細胞」を、被験体の免疫処置に使用する。2)適切な腫瘍性抗原をコードするクローン化遺伝子配列を、繊維芽細胞または抗原提示細胞のような細胞中に、転移し得る。次いで、これらの細胞を、CE細胞またはキャリアー細胞と混合し、被験体を免疫処置する。3)腫瘍性抗原を、細菌または他

のタイプの細胞中で、組換え処理によりクローン化し得る。次いで、これらの抗原を精製し、CE細胞および/またはキャリアー細胞を用いる免疫処置に使用する。4)腫瘍性抗原を、腫瘍細胞から精製し得、CE細胞またはキャリアー細胞を用いて被験体を免疫処置するために使用し得る。5)腫瘍細胞を、被験体の免疫処置のために、照射し得、あるいは機械的に破砕し得、そしてCE細胞および/またはキャリアー細胞と混合し得る。

本発明は、以下の工程を包含する：(A)CE細胞またはキャリアー細胞の生産に適切な細胞を単離する工程；(B)サイトカイン遺伝子を単離する工程、またはサイトカイン遺伝子および腫瘍性抗原遺伝子ならびに適切なマーカー遺伝子および/または自殺遺伝子を単離する工程；(C)(B)から得た遺伝子を転移し、CE細胞またはキャリアー細胞を生産する工程；(D)CE細胞またはキャリアー細胞を用いて免疫処置するために、被験体の腫瘍性抗原または他の適合する腫瘍性抗原の免疫学的サンプルを調製する工程；(E)免疫処置のために腫瘍細胞を腫瘍性抗原の供給源として用いる場合、その腫瘍細胞の悪性の潜在力を不活化する工程；および(F)免疫処置用のサンプルを調製する工程。以下は、発明者らにより考慮されたいくつかの実施態様である。しかしながら、当業者に周知のいかなる手段も、これらの工程を達成するために、本発明において使用し得ることが理解される。

(A)CE細胞およびキャリアー細胞を生産するための細胞の単離

CE細胞およびキャリアー細胞として使用される細胞は、被験体の体の種々の位置から選択され得る。例えば、皮膚パンチバイオプシーは、被験体へ最小量で侵入させることにより、CE細胞の生産用の繊維芽細胞が容易に入手され得る供給源を提供する。または、これらの繊維芽細胞は、腫瘍サンプル自体から入手され得る。造血由来の細胞は、脾臓穿刺、骨髓吸引、リンパ節バイオプシー、または腫瘍サンプルから得られる。CE細胞またはキャリアー細胞の生産用の他の適切な細胞は、当業者に周知の手段により単離され得る。同様に選択され、そして処理される非自己の細胞もまた、使用され得る。

(B)遺伝子の単離

非常に多くのサイトカイン遺伝子が、クローン化され、本プロトコルにおける使用に有効である。IL-2、 γ -IFNおよび他のサイトカインの遺伝子が、容易に使用され得る(1-5、11-14)。適切な腫瘍性抗原のクローン化遺伝子は、当該分野で周知の手段により単離される。

ネオマイシン抵抗性(Neo^r)のような選択可能なマーカー遺伝子が、容易に入手され得る。選択可能なマーカー遺伝子の組み込みにより、所望の遺伝子を首尾よく受容し、発現した細胞の選択が可能になる。遺伝子転移技術の当業者に周知の他の選択可能なマーカー遺伝子もまた、所望の転移遺伝子を発現するCE細胞またはキャリアー細胞の生産に使用され得る。

「自殺」遺伝子は、免疫応答の刺激後に、選択的に誘導可能な致死を生じさせるために、CE細胞またはキャリアー細胞中に組み込まれ得る。単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子(TK)のような遺伝子は、CE細胞またはキャリアー細胞の誘導可能な崩壊を引き起こすために使用され得る。CE細胞またはキャリアー細胞が、もはや有効でなくなった場合、アシクロビルまたはガンシクロビルのような薬剤が投与され得る。これらの薬剤はいずれも、TKを発現する細胞を選択的に殺し、それにより、移植され形質導入された細胞を除去する。さらに、自殺遺伝子は、誘導可能なプロモーターに結合した非分泌細胞障害性ポリペプチドをコードする遺伝子であり得る。CE細胞またはキャリアー細胞の崩壊が所望とされる場合、自殺遺伝子が細胞障害性ポリペプチドの生産を誘導し、その結果CE細胞またはキャリアー細胞を殺すように、プロモーターの適切な誘発物質を投与する。しかしながら、CE細胞またはキャリアー細胞の崩壊は、必ずしも必要とされるわけではない。

所望の腫瘍性抗原をコードする遺伝子は、組換え法によりクローン化され得る。多数の腫瘍により発現される抗原のコード配列は、多数の被験体に使用され得る。

(C)遺伝子の転移

培養細胞中に遺伝子を転移するために、非常に多くの方法が、使用され得る(15)。例えば、適切な遺伝子を、プラスミドまたはレトロウイルスのようなベクター中に挿入し得、そ

して細胞中に転移し得る。エレクトロポレーション、リポフュージョンおよび種々の他の方法が、当該分野で知られており、用いられ得る。

遺伝子転移の1つの方法は、以前のヒト遺伝子転移の研究において用いられた方法と同様の方法であり、腫瘍浸潤リンパ球(tumor infiltrating lymphocyte)(TIL)を、レトロウイルス遺伝子形質導入により改変し、癌被験体に投与した(16)。このレトロウイルス介在遺伝子転移の第1段階の安全性の研究において、TILを遺伝的に改変して、ネオマイシン抵抗性(Neo^R)遺伝子を発現させた。静脈内注入を行った後、ポリメラーゼ連鎖反応分析では、投与後2ヶ月の間、一貫して循環中に遺伝的に改変された細胞が見出された。感染性レトロウイルスは、これらの被験体中には全く発見されず、そして、遺伝子転移による副作用は、どの被験体中にも見られなかった(16)。これらのレトロウイルスベクターを改変し、ウイルスのgag, polおよびenv遺伝子の削除によりウイルスの複製を防止した。

レトロウイルスを遺伝子転移に使用する場合、複製受容体を有するレトロウイルスが、レトロウイルスベクターを生産するために使用されるパッケージング細胞系において、レトロウイルスベクターおよびウイルス遺伝子配列の間での組換えにより理論的に発生する。我々は、組換えによる複製受容体を有するウイルスの生産が減少したまたは排除されたパッケージング細胞系を使用する。このことから、被験体細胞を

感染させるのに使用されるすべてのレトロウイルスベクターの上清を、PCRおよび逆転写酵素アッセイのような標準的なアッセイにより、複製受容体を有するウイルスに対しスクリーニングする(18)。さらに、複製受容体を有するウイルスに曝すことが、必ずしも有害であるとは限らない。複製受容体を有するマウスレトロウイルスの多量の複製物を注入した霊長類の研究において、そのレトロウイルスは、霊長類の免疫系により排除された(17)。複製受容体を有するウイルスに原因する疾病または後遺症は、曝した3年後にはまったく観察されなかった。要約すると、被験体が複製受容体を有するマウスレトロウイルスに曝されることは予期されず、そしてそのように曝されることが、必ずしも有害ではないと思われる(17)。

(D) 被験体の腫瘍性抗原または精製組換え腫瘍性抗原の免疫学的サンプルの調製

腫瘍の関与する抗原を有する腫瘍細胞が、被験体から単離される。これらの細胞は、固形癌または白血病性腫瘍の一方に由来する。固形癌については、単細胞懸濁液が、バイオプシー組織の機械的分離および洗浄により作られ得る(18)。

造血腫瘍は、末梢血液または骨髓から、標準的な方法で単離され得る(19)。

第二の変型は、腫瘍細胞のホモジェネートの使用である。このようなホモジェネートは、本発明による刺激があった際に、被験体の免疫系により認識するのに有用な腫瘍性抗原を

含有し得る。例えば、細胞を機械的に破壊することで、あるいは凍結・融解することで作られる非分画細胞ホモジェネート、または、好ましくは濃縮レベルの腫瘍性抗原を伴うホモジェネートの画分が使用され得る。

同様に、例えば免疫沈降法またはDNA組換え法により得られた精製腫瘍抗原が使用され得る。次いで、精製抗原は、上記のCE細胞および/またはキャリアー細胞と共に免疫処置に使用され、これらの抗原に対する被験体の免疫応答を誘発または高める。

キャリアー細胞を使用する実施形態では、腫瘍性抗原は、キャリアー細胞による発現中ずっと使用され得る。これらのキャリアー細胞は、単独で、または、他の腫瘍性抗原調製物またはCE細胞と共に注入され得る。同様に、CE細胞が用いられる場合は、当該分野で周知の方法で生成された精製組換え腫瘍性抗原が使用され得る。

自己の腫瘍細胞が容易に入手され得なければ、異種の腫瘍細胞、それらのホモジェネート、それらの精製抗原、またはそのような抗原を発現しているキャリアー細胞が使用され得る。

(以下余白)

(E) 腫瘍細胞の不活性化

生存可能な腫瘍細胞を、腫瘍性抗原の供給源として免疫処置に使用する場合、腫瘍細胞は、被験体中で増殖しないように不活性化され得る。不活性化は、いくつかの方法で達成され得る。細胞は、免疫処置の前に照射され得る(18)。この照射は、それらの複製を阻止するレベルであり得る。次いで、このような生存可能な細胞は、それらの腫瘍性抗原を、被験体の免疫系に提供し得るが、新しい腫瘍を形成するほどには増殖し得ない。

または、培養され得る腫瘍細胞は、自殺遺伝子を形質導入され得る。上記のように、単独ヘルペスチミジンキナーゼ(TI)のような遺伝子を、腫瘍細胞に転移し、アシクロビルまたはガンシクロビルの投与により、それらの増殖を誘導し得る。免疫処置の後、TI発現腫瘍細胞は、それらの腫瘍性抗原を提供し得、増殖し得る。被験体の免疫応答が刺激される期間の後、この細胞は選択的に殺され得る。おそらく、このアプローチは、免疫処置に使用される腫瘍細胞をより長く生存させる。そして、このことは、抗腫瘍性免疫を誘導または高めることに有利である。

(F) 免疫処置のための試料の調製

CE細胞および/またはキャリアー細胞および腫瘍細胞、および/または腫瘍細胞のホモジェネートおよび/または精製腫瘍性抗原、を患者の免疫処置のために結合する。約 10^7 個の腫瘍細胞が必要とされる。腫瘍細胞のホモジェネート、また

実施例1

照射腫瘍細胞と混合した

IL-2を発現する繊維芽細胞による免疫処置

1) IL-2分泌C8細胞の生産に使用する

自己の繊維芽細胞の集積

皮膚パンチバイオペレーを、滅菌条件下で各被験体から得る。そのバイオペレー組織を細断し、10%のウシ胎児血清を含有するBPM1640培地(または類似の培地)中に入れ、培養において皮膚繊維芽細胞の成長を樹立する。この培養繊維芽細胞は、レトロウイルス介在IL-2遺伝子転移によりIL-2分泌C8細胞を生産するために使用する。

2) レトロウイルスベクターの調製

およびIL-2分泌C8細胞の生産

次いで、培養皮膚繊維芽細胞を、IL-2およびネオマイシン抵抗性(Neo^r)遺伝子を含有するレトロウイルスベクターに感染させる。Neo^r遺伝子を含有するN1ベクターを使用し、このベクターは、これまで多数の研究者により、ヒトを題材とする研究(14)を含み、インビトロおよびインビボの研究に使用されてきた。このIL-2ベクターは、N1由来のベクターである、Friedmannおよびその共同研究者により開発され記載されたLBNLから生産される(10)。それは、LBNLのルシフェラーゼ遺伝子を、ヒトIL-2をコードする完全長のcDNAと置換すること

は腫瘍性抗原の精製または非精製成分を用いるとき、腫瘍の用量を、 10^7 個の未処理の腫瘍細胞で通常存在する腫瘍性抗原の正常数に基づいて調整し得る。腫瘍の調製は、治療を妨げる実質的に全身的な毒性を生ずることなく、抗腫瘍免疫性(11-12)を誘起するサイトカインのレベルを分泌するのに十分な数のCEまたはキャリアー細胞を混合すべきである。

サイトカインは、CE細胞またはキャリアー細胞により、免疫応答を誘起または増大するのに十分であるが、実質的に全身的な毒性を避けるのに十分ではないレベルで、生成されるべきである。これにより、サイトカインの生理学的レベルより大きい従来の方法の投与により生じる副作用を防ぐ。

これらの混合物、および単独で使用するキャリアー細胞は、注入のために、当該分野で既知であって、免疫処置に受容可能な、どのような様式にも製剤され得る。少なくともC8細胞およびキャリアー細胞が、生存可能であることが重要なので、この製剤は細胞の生存に適合しなければならない。製剤は、皮下注射、筋内注射され得、または免疫処置に受容可能ないかなる様式の注入もなされ得る。

免疫応答を望ましくない抗原に集中させ得る調製物中の汚染物質は、免疫処置の前に除去しなければならない。

以下の実施例は、本発明のいくつかの実施態様の説明のために提供するもので、本発明の範囲を限定するものと解すべきではない。

で作られる。汚染性で複製受容能を有するウイルスを含まないレトロウイルスベクターを、ベクタープラスミド構築物をヘルパーフリーパッケージング細胞系PA317中にトランスフェクトすることで生産する。被験体細胞の感染の前に、このベクターが、ヘルパーウイルスを含まないことが示される。ヘルパーウイルスが検出される場合、そのベクターを、ウイルスのgagおよびpol遺伝子がenvから離れているGP+envΔM12パッケージング細胞系中で生産し、ヘルパーウイルス生産の可能性をさらに減少させる。

3) 形質導入プロトコル

培養皮膚繊維芽細胞を、(20)に記載のように、パッケージング細胞系由来の上清と共にインキュベートする。これらの細胞由来の上清を、外来性因子および複製受容能を有するウイルスについて、(18)に記載のように試験し、表1に概要を示す。この繊維芽細胞を、洗浄し、次いでG418(ネオマイシン類似物)を含有する培地中で増殖させ、Neo^r遺伝子が発現している形質導入細胞を選別した。このG418抵抗性細胞を、固相酵素免疫測定法(ELISA)により培養の上清中のIL-2の濃度を測定することで、IL-2遺伝子が発現について試験する(12)。IL-2を発現しているG418抵抗性(resilient)細胞は、-70°Cで、以後、免疫処置に使用するために必要になるまで貯蔵する。

表1

外来性因子および安全性試験

1. 無菌度
2. マイコプラズマ
3. 一般的安全性
4. ウイルス試験
 - LCMウイルス
 - 腫瘍因子(Typhic agent)
 - S+/L- eco
 - S+/L-xeno
 - S+/L- sapbo
 - ST3増殖
 - MRC-1/Vero

4) 照射腫瘍細胞の調製

臨床的に示唆される外科的な切除から、または浅リンパ節または皮膚転移から得られた腫瘍を、2~3mmの細片に細断し、コラーゲナーゼおよびDNアーゼで処理し、単細胞懸濁液中への腫瘍の分離を容易にした。集めた細胞を、遠心分離し、BPM1640培地中で洗浄し、次いで、10%のジメチルスルホキシドおよび50%のウシ胎児血清を、BPM1640培地中に含有する溶液中で凍結保存する。これらの細胞は、投与のときまで液体窒素中に貯蔵する。皮下免疫処置において使用する前に、これらの細胞を、解凍し、免疫原性汚染物質を含まない培地中で

洗浄し、そして、セシウム照射装置中で、4,000ラド/分、総線量20,000ラドの照射をした。

5) 被験体の選択

被験体は、組織学的に確認された癌の診断を有する。治療の目的で切除する必要のある腫瘍、または、バイオプシーが容易に接近し得る腫瘍を有する被験体は、本発明の本実施形態に最も適切である。

6) 処置前評価

以下の処置前評価を、実施した。

1) 疾病の活動度の記載および定量化を包含する病歴および身体検査。

2) 動作の状態の評価(Performance Status Assessment)

- 0 = 正常、無症状
- 1 = 制限あり、しかし、通院可
- 2 = 覚醒時の50%以上、起床している、自動能力あり
- 3 = 覚醒時の50%以上、ベッドまたは椅子から離れない
限定された自動能力
- 4 = 寝たきり

3) 処置前実験

分画でのCBC(CBC with differential)、血小板数、PT、PTT、グルコース、BUN、クレアチニン、電解質、SGOT、SGPT、LDH、アルカリホスファターゼ、ビリルビン、尿酸、カルシウム

8) 最終の処方

各被験体は、照射腫瘍細胞とIL-2を分泌するように遺伝的に改変された自己の幹細胞細胞との混合物を用いる皮下免疫処置を受ける。約 10^7 個の腫瘍細胞を、組織培養において、半集密の場合少なくとも10単位/mlのIL-2を分泌することが知られている 10^7 個の幹細胞細胞と混合する(12)。この照射腫瘍細胞および遺伝的に改変された幹細胞細胞を、免疫処置のために、最終容積が0.1mlになるように通常生理食塩水に入れる。

9) 投与量の調整

2週間経過後、照射腫瘍細胞、および、IL-2を分泌するように遺伝的に改変された自己の幹細胞細胞を用いて、少なくとも2回の皮下免疫処置を施す。毒性がまったく観察されなければ、引き続き、追加免疫処置を定期的(少なくとも1週間経過後)に施し、抗腫瘍性免疫応答を最適化し得る。

1) 潜在的毒性の処置

これらの免疫処置から、有毒な副作用が起こることは予想されない。しかしながら、これらの免疫処置の潜在的な副作用は、以下の様式で処置可能である：

大量の腫瘍細胞溶解が起これば、その結果起こる尿酸ネフロパシー、成人呼吸促進症候群、汎発性血管内凝固症候群またはカリウム過剰血症は、標準的な方法により処置される。

ム、癌タンパク質アルブミン。

4) 他分析：

尿分析

CRP、CaおよびCa血清補体レベル、

末梢血液B細胞およびT細胞サブセットの免疫表現型分析(immunophenotyping)

末梢血液細胞における検出可能な複製受容体を有するウイルスに対するアッセイ

Neo^r、IL-2およびウイルスenvについての、末梢血液白血球のPCRアッセイ

5) 他処置前評価：

胸部X線および、コンピューター運動断層撮影(CT)、磁気共鳴画像法(MRI)または放射性核種スキャンを包含する他の診断的研究を、疾病の活動の程度を記録し、定量化するために実施し得る。

これらの評価に続いて、一定の間隔(約1-3月毎)で、治療の過程に行う評価が、治療および潜在的な毒性に対する応答を測定することに有用であり、その評価により、施される免疫処置の回数が調整される。

1) 並立療法との制限

この処置の効果を最良にするために、被験体は、免疫系を抑制することが知られている並立療法を受けるべきではない。

免疫処置の部位の局所的毒性は、局所ステロイドおよび/または適切と思われる注入部位の外科的な切除で処置される。

悪寒、発熱および/または発疹のような過敏反応は、対応療法的に、解熱薬および抗ヒスタミン剤を用いて処置される。被験体は、予防薬を用いて処置されるべきではない。関節痛、リンパ節症または腎機能不全が起こった場合、コルチコステロイドおよび/または抗ヒスタミン剤での処置を始める。アナフィラキシーは、エピネフリン、液体、およびステロイドの投与のような標準的手段により処置される。

(以下余白)

実施例II

A. 線維芽細胞中でのレトロウイルス1L-2遺伝子転移および発現

マウスおよび初代ヒト線維芽細胞中で1L-2およびネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を転移して発現するのに、レトロウイルスベクターを使用した。Gillboeおよび共同研究者らによって生成されたレトロウイルスベクターDC/TK1L2(Ganebacherら, J. Exp. Med., 172:1217-1223, 1990, これは本明細書中に参考として援用されている)を利用して動物腫瘍モデルにおいて適用するためにマウス線維芽細胞に形質導入した(以下のB項を参照のこと)。ヒト線維芽細胞を、レトロウイルスベクターLXSN-R1-IL2を用いて形質導入した。これらのレトロウイルスベクターの構造の概略図を図1に示す。LXSN-R1-IL2ベクターのより完全な記述を、そのスクレオチド配列を含めて、実施例IIIおよび表2、3および4に示す。

上記のベクターを用いた感染およびネオマイシン類似体0418を含有する増殖培地中での2〜3週間の選択に続いて、Balb/cおよびヒト線維芽胎児培養上清を採取し、そして固相酵素免疫測定法(ELISA)によって、1L-2についてテストした。図2は、形質導入された線維芽細胞により分泌された1L-2のレベルを表す。

これらの結果は、ルシフェラーゼまたはβ-ガラクトシダーゼのような不適切な遺伝子を発現するH2由来レトロウイルスベクターで感染したネガティブコントロールの線維芽細胞、

および成人ヒト線維芽細胞を用いた研究を用いて確認し得る。

形質導入したヒト線維芽細胞により発現した1L-2の生物学的活性を、1L-2依存性T細胞系を使用した細胞増殖バイオアッセイによって確認した。このアッセイでは、形質導入した線維芽細胞およびコントロールの未改変の線維芽細胞からの上清を、1L-2依存性T細胞系CTLL-2と共にインキュベートした。細胞増殖および1L-2活性の指標として³H-チミジンの取り込みを測定した(図3)。

B. 動物腫瘍モデルにおける形質導入した線維芽細胞の効力

1L-2を分泌するように遺伝学的に改変した線維芽細胞の効力を結腸癌の動物モデルでテストした。これらの研究において、Balb/c CT26腫瘍細胞系を、形質導入して1L-2を発現するBalb/c線維芽細胞とともに皮下注射した。コントロール群は、1) CT26腫瘍細胞および未改変線維芽細胞の混合物; 2) 線維芽細胞を含まないCT26腫瘍細胞; および3) 形質導入された線維芽細胞単独を注射した動物を含有した。形質導入線維芽細胞およびCT26細胞で処理した動物の8分の3で腫瘍が検出されなかった。これとは対照的に、CT26腫瘍細胞を注射された全てのコントロール動物(8/8)は、触診でわかるほどの腫瘍を発達させた。CT26腫瘍細胞を含まない形質導入線維芽細胞を接種した動物では、腫瘍は検出されなかった。1L-2分泌線維芽細胞を注射したBalb/cマウスにおける平均CT26腫瘍サイズは、コントロール群と比べてかなり小さかった(図4)。

多変量非母数統計手法(Kozioら, Biometrics 37:383-390, 1981およびKozioら, Computer Prog. Biomed. 19:99-114, 1984, これらは本明細書中に参考として援用されている)を利用して、処置群中の腫瘍増殖の違いを評価した。図4に示す4つの処置群に対する腫瘍増殖曲線は、有意に異なっていた($p=0.048$)。続いて行った処置群間の比較は、腫瘍の増殖においてCT26腫瘍細胞だけを注射した動物と 2×10^6 個の形質導入線維芽細胞およびCT26腫瘍細胞で処理した動物との間に有意な相違($p<0.05$)を示した(図4)。

実施例III

A. 計画の概要

癌のリンホカイン遺伝子治療は、通常の治療に失敗した患者において評価される。ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を含有するH2由来レトロウイルスベクターを用いる。このベクターは、最近のヒト被験者を用いた定評ある研究を含むインビトロおよびインビボでの研究について、多くの研究者によって使用してきた(Rosenbergら, N. Eng. J. Med., 323:570-578, 1990)。本研究で用いられるリンホカインベクターは、Millerらによって開発され記載されている、H2由来ベクター、LXSNから生成される(Millerら, Mol. Cell Bio. 1, 5:2895, 1986およびMillerら, BioTechniques 7:880, 1989)これらの文献は本明細書中に参考として援用されている。ベクターLXSN-R1-IL2は、レトロウイルス3'LTRプロモーターの

制御下でヒト1L-2 cDNAを、そして5'40プロモーター制御下でネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を含有する(図1を参照のこと)。正常のヒト1L-2リーダー配列を、ラットインスリンおよびヒト1L-2リーダー配列を含有するカメラ配列で置き換えた(表2、3、および4を参照のこと)。このカメラリーダー配列は、1L-2遺伝子の発現を高める。

LXSN-R1-IL2ベクターを構築するために、完全長1L-2 cDNAおよびカメラリーダー配列を含有する細菌プラスミドpBC12/CMT/IL2(Cullen, B. R., DNA 7:845-850, 1988, 本明細書中に参考として援用されている)を、EcoIIIで切断し、そして末端をKlenowポリメラーゼを用いて平滑化した。1L-2 cDNAを、続いてBamHIを用いた切断によりプラスミドから切り離した。1L-2フラグメントを、1%アガロースゲル中で電気泳動により精製し、そして適切なバンドを、ガラスパウダー柱を利用して抽出した。簡単にはゲルスライスを55°で4M NaIに溶解した。室温にまで冷却した後、4μlの酸化シリカ溶液(BIO-101, La Jolla, CA)を添加して、DNAを吸着した。次いで、シリカを、TE緩衝液中で0.1M NaClを含有する80%エタノールの冷溶液で洗浄した。DNAを、蒸留水中で55°で加熱することによりシリカから溶出した。次いで、精製1L-2 cDNAを、pLXSN-R1-IL2ベクターおよびその部分的スクレオチド配列のより完全な記載を、表2、3、4、5、および6に示す。

表 2

1位から6385位までのLASH-R1-IL2の記載

塩基	記載
1-581	モロニーマウス肉腫ウイルス5'LTR
639-1438	延長したパッケージングシグナルの配列
1449-2151	キャプラー配列を有するIL-2 cDNA
1469-1718	IL-2キャプラー配列
1847-1718	シグナルペプチドのコード領域
1719-2151	成熟IL-2コード配列
2158-2159	Mo su肉腫ウイルス末端/SV40開始
2159-2303	サルウイルス40初期プロモーター
2321-2522	サルウイルスDNA末端/Tn5 DNA開始
2557-3351	ネオマイシンホストトランスフェラーゼ
3370-3371	Tn5 DNA末端/モロニーマウス白血病ウィルス開始
3411-4004	モロニーマウス白血病ウイルス3'LTR
4073-4074	モロニーマウス白血病DNA末端/pBR322 DNA開始
4074-6385	プラスミド骨格

(以下余白)

表 3

酵素 (4000bp)

位置

Aat1	[2]	1961, 2481
Aat2	[2]	811, 6295
Acc1	[1]	4252
Acc2	[19]	392, 394, 443, 969, 971, 1193, 2751, 3052, 3084, 3807, 3809, 4081, 4083, 4186, 4527, 5108, 5438, 5931, 6263
Acy1	[5]	808, 2685, 3860, 5910, 6292
Afl1	[13]	260, 273, 328, 626, 756, 1277, 3201, 3676, 3689, 3744, 4041, 5511, 5733
Afl2	[4]	34, 1064, 1955, 3446
Afl3	[2]	1592, 4480
Aha1	[20]	161, 237, 473, 474, 602, 644, 789, 2689, 2849, 3578, 3653, 3888, 3889, 4017, 4059, 4126, 4161, 4860, 5556, 5907
Aha2	[5]	808, 2685, 3860, 5910, 6292
Aha3	[3]	5239, 5258, 5950
Alu1	[33]	29, 33, 119, 190, 411, 654, 734, 742, 1470, 1486, 1751, 1935, 2003, 2446, 2500, 2791, 3249, 3441, 3445, 3532, 3607, 3826, 4069, 4122, 4141, 4422, 4648, 4738, 4784, 5041, 5562, 5662, 5725
Alw1	[20]	1110, 1414, 1665, 2018, 2147, 2160, 2529, 2533, 2864, 2929, 3110, 4027, 5041, 5127, 5129, 5225, 5226, 5689, 6006, 6010
AlwN1	[4]	231, 3572, 3647, 4896
Aoc1	[2]	847, 1076
Aoc2	[19]	323, 413, 426, 597, 1583, 1721, 2631, 2724, 2798, 2988, 3050, 3759, 3828, 3841, 4012, 4300, 4798, 5959, 6044
Aos1	[2]	2787, 5395
ApaL1	[4]	1717, 4295, 4794, 6040
BspR1	[3]	5200, 6208, 6313
BspM1	[4]	1501, 2500, 2572, 2953
BsaB2	[4]	392, 443, 3082, 3807
BstE2	[1]	1145
BstN1	[22]	315, 623, 801, 814, 1227, 1252, 1275, 1293, 1328, 1526, 1536, 1558, 1630, 2196, 2251, 2268, 3072, 3731, 4038, 4508, 4629, 4642
BstO1	[19]	392, 394, 443, 969, 971, 1193, 2751, 3052, 3084, 3807, 3809, 4081, 4083, 4186, 4527, 5108, 5438, 5931, 6263
BstX1	[1]	2060
BstY1	[11]	2010, 2152, 2521, 2856, 3102, 5121, 5132, 5218, 5230, 5998, 6015
Bsu36I	[2]	847, 1076
Ccr1	[1]	1998
Cfo1	[31]	394, 396, 445, 447, 714, 971, 2679, 2687, 2751, 2788, 3054, 3084, 3086, 3314, 3809, 3811, 3862, 4083, 4186, 4216, 4337, 4390, 4660, 4727, 4827, 5001, 5110, 5503, 5596, 5933, 6263
Cfr1	[9]	656, 790, 1167, 1188, 2391, 2765, 3156, 3183, 3761
Cfr10I	[3]	3004, 3185, 5453
Cfr13I	[29]	169, 200, 245, 260, 273, 328, 626, 756, 826, 839, 1043, 1254, 1277, 1292, 1649, 3201, 3541, 3586, 3616, 3661, 3676, 3689, 3744, 4041, 5415, 5494, 5511, 5733, 6349
Cvn1	[2]	847, 1076
Dde1	[23]	75, 165, 191, 282, 553, 847, 1076, 1348, 1692, 2442, 3348, 3487, 3582, 3657, 3698, 3879, 3967, 4290, 4755, 5164, 5330, 5870, 6296
Dpn1	[30]	95, 1104, 1236, 1421, 1659, 2012, 2154, 2523, 2528, 2547, 2858, 2936, 3017, 3026, 3104, 3507, 4021, 5048, 5123, 5134, 5142, 5220, 5232, 5337, 5678, 5696, 5742, 6000, 6017, 6053

Apy1	[22]	315, 623, 801, 814, 1227, 1252, 1275, 1293, 1325, 1526, 1536, 1558, 1630, 2196, 2251, 2268, 3072, 3731, 4038, 4508, 4629, 4642
Aqu1	[6]	241, 472, 1998, 3821, 3854, 3887
Ase1	[2]	1801, 5545
Asp700	[1]	5972
Asp718	[2]	476, 3891
AspA1	[1]	1145
Asu1	[29]	169, 200, 245, 260, 273, 328, 626, 756, 826, 839, 1043, 1254, 1277, 1332, 1649, 3201, 3541, 3586, 3616, 3661, 3676, 3689, 3744, 4041, 5415, 5494, 5511, 5733, 6349
Ava1	[6]	241, 472, 1998, 3821, 3854, 3887
Ava2	[13]	260, 273, 328, 626, 756, 1277, 3201, 3676, 3689, 3744, 4041, 5511, 5733
Ava3	[2]	2232, 2304
Avr2	[2]	1962, 2482
Bal1	[3]	658, 1169, 2767
BamH1	[1]	2152
Ban1	[9]	318, 476, 1200, 2684, 2719, 3734, 3859, 3891, 5321
Ban2	[8]	413, 426, 597, 1583, 3050, 3828, 3841, 4012
Ebe1	[2]	2688, 3863
Ebv1	[22]	989, 997, 1738, 2493, 2632, 2758, 2800, 2816, 2909, 3221, 4060, 4131, 4228, 4372, 4390, 4809, 4899, 4902, 5108, 5411, 5600, 5802
Bcl1	[1]	2526
Bgl1	[2]	2435, 5493
Bsp1286I	[19]	323, 413, 426, 597, 1583, 1721, 2631, 2724, 2798, 2988, 3050, 3739, 3828, 3841, 4012, 4300, 4798, 5959, 6044

附表平7-503455 (11)

Dra1	[3]	5239, 5258, 5950
Dra2	[4]	328, 1277, 3744, 6349
Eae1	[9]	556, 790, 1167, 1188, 1591, 2765, 3156, 3183, 5761
Eag1	[2]	790, 2591
Eco47I	[13]	260, 273, 328, 626, 756, 1277, 1201, 3676, 3689, 3744, 4041, 5511, 5733
Eco52I	[2]	790, 2591
Eco81I	[2]	847, 1076
EcoN1	[2]	850, 1450
EcoG109I	[4]	326, 1277, 3744, 6349
EcoR1	[1]	1460
EcoR1*	[14]	938, 1037, 1460, 1798, 1805, 1928, 2064, 2121, 2236, 2308, 2400, 5240, 5546, 5801
EcoR2	[22]	313, 621, 799, 812, 1225, 1290, 1273, 1293, 1323, 1524, 1534, 1558, 1628, 2194, 2249, 2266, 3070, 3729, 4036, 4506, 4627, 4640
EcoR5	[4]	137, 213, 3554, 3629
EcoT22I	[2]	2232, 2304
Fdi2	[2]	2787, 5595
Fnu4B1	[41]	793, 967, 983, 986, 1191, 1752, 2430, 2507, 2594, 2646, 2657, 2747, 2752, 2789, 2830, 2917, 2920, 2923, 3159, 3255, 3296, 3310, 4074, 4120, 4217, 4270, 4386, 4404, 4407, 4525, 4680, 4823, 4888, 4891, 5097, 5425, 5514, 5764, 5791, 5886, 6115
FnuD2	[19]	392, 394, 445, 969, 971, 1193, 2751, 3052, 3084, 3807, 3809, 4081, 4083, 4186, 4527, 5108, 5438, 5931, 6263
Fok1	[13]	498, 1198, 1358, 1679, 2333, 2552, 3009, 3034, 3912, 4168, 5339, 5520, 5807
Fsp1	[2]	2787, 5595
Hae2	[4]	2688, 3863, 4358, 4728

Hae2	[11]	808, 1139, 1180, 1987, 2801, 2988, 4233, 5183, 5559, 5972, 6292
Hae3	[20]	38, 1052, 1080, 1145, 1289, 1478, 1706, 2805, 3111, 3450, 4134, 4229, 4836, 4899, 5015, 5298, 5629, 5687, 5840, 6028
Hbo1	[30]	93, 1102, 1234, 1419, 1657, 2010, 2152, 2521, 2526, 2545, 2856, 2934, 3015, 3024, 3102, 3505, 4019, 5046, 5121, 5132, 5140, 5218, 5230, 5335, 5676, 5694, 5740, 5998, 6015, 6051
Hbo2	[17]	444, 1145, 1356, 1575, 1617, 1908, 1911, 3046, 3256, 3336, 4351, 5142, 5213, 5968, 6046, 6155, 6351
Hnl1	[54]	291, 444, 508, 534, 560, 639, 841, 939, 1227, 1330, 1363, 1369, 1372, 1378, 1408, 1411, 1426, 1433, 1449, 1559, 1620, 1909, 1921, 2412, 2418, 2443, 2449, 2455, 2458, 2470, 2508, 2835, 2899, 2735, 3092, 3286, 3707, 3859, 3878, 3923, 3948, 3974, 4054, 4087, 4117, 4379, 4587, 4662, 4911, 5311, 5392, 5540, 5746, 6339
Hae1	[22]	35, 1065, 1177, 1207, 1231, 1801, 1843, 1956, 1971, 2124, 2139, 3447, 4261, 5186, 5238, 5243, 5257, 5310, 5845, 5884, 5949, 6321
Hsp1	[30]	161, 237, 473, 601, 643, 789, 2590, 2667, 2689, 2717, 2848, 2938, 3005, 3186, 3578, 3653, 3888, 4016, 4058, 4126, 4160, 4687, 4834, 4860, 5050, 5454, 5488, 5555, 5665, 5907
Hst1	[2]	2787, 5595
Hst2	[2]	847, 1076
Hval	[22]	315, 623, 801, 814, 1227, 1252, 1273, 1295, 1325, 1526, 1536, 1558, 1630, 2196, 2251, 2268, 3072, 3731, 4038, 4508, 4629, 4642
Hae1	[1]	3187
Hae1	[2]	2685, 3860
Hcl1	[20]	161, 237, 473, 474, 602, 644, 789, 2689, 2849, 3578, 3653, 3888, 3889, 4017, 4059, 4126, 4161, 4860, 5556, 5907
Hcol	[2]	2389, 3117

Hae3	[35]	171, 202, 247, 658, 792, 828, 840, 1045, 1169, 1190, 1255, 1534, 1650, 1866, 1961, 2423, 2429, 2438, 2481, 2593, 2767, 3158, 3185, 3543, 3588, 3618, 3663, 4495, 4506, 4524, 4958, 5416, 5496, 5763, 6350
Hap2	[30]	161, 237, 473, 601, 643, 789, 2590, 2667, 2689, 2717, 2848, 2938, 3005, 3186, 3578, 3653, 3888, 4016, 4058, 4126, 4160, 4687, 4834, 4860, 5050, 5454, 5488, 5555, 5665, 5907
Hqal	[8]	455, 707, 960, 1580, 4175, 4591, 5169, 5899
Hqial	[9]	413, 1721, 2798, 2988, 3828, 4300, 4798, 5959, 6044
Hhal	[31]	394, 396, 445, 447, 714, 971, 2679, 2687, 2751, 2788, 3054, 3084, 3086, 3114, 3809, 3817, 3862, 4083, 4186, 4216, 4357, 4380, 4680, 4727, 4827, 5001, 5110, 5503, 5596, 5933, 6265
HinP1	[31]	392, 394, 443, 445, 712, 969, 2677, 2685, 2749, 2786, 3052, 3082, 3084, 3312, 3807, 3809, 3860, 4081, 4184, 4214, 4395, 4388, 4658, 4725, 4825, 4999, 5108, 5501, 5594, 5931, 6263
Hinc2	[1]	5914
Hind2	[1]	5914
Hind3	[1]	2498
Hinf1	[14]	298, 517, 857, 868, 1553, 1814, 3170, 3304, 3356, 3881, 4380, 4455, 4851, 5368
Hpa2	[30]	161, 237, 473, 601, 643, 789, 2590, 2667, 2689, 2717, 2848, 2938, 3005, 3186, 3578, 3653, 3888, 4016, 4058, 4126, 4160, 4687, 4834, 4860, 5050, 5454, 5488, 5555, 5665, 5907
Hph1	[11]	1214, 1240, 1817, 2863, 4102, 4111, 5216, 5443, 5859, 6065, 6100
Kpn1	[2]	480, 3895
Mae1	[15]	30, 293, 689, 717, 739, 1452, 1606, 1893, 1963, 2483, 3442, 3709, 4975, 5228, 5563

Hde1	[1]	4303
Hde2	[30]	93, 1102, 1234, 1419, 1657, 2010, 2152, 2521, 2526, 2545, 2856, 2934, 3015, 3024, 3102, 3505, 4019, 5046, 5121, 5132, 5140, 5218, 5230, 5335, 5676, 5694, 5740, 5998, 6015, 6051
Hhe1	[2]	29, 1605, 3441
Hla3	[26]	61, 1263, 1596, 1649, 1835, 1856, 2030, 2230, 2302, 2393, 2559, 2904, 3050, 3121, 3147, 3473, 4119, 4224, 4484, 5204, 5695, 5705, 5783, 5819, 6212, 6317
Hla4	[28]	153, 246, 262, 320, 478, 627, 758, 827, 959, 1202, 1279, 2154, 2200, 2272, 2686, 2721, 3678, 3736, 3861, 3893, 4042, 4512, 4551, 5323, 5417, 5458, 5669, 6259
Hel1	[2]	2232, 2304
Hsp(7524)1	[8]	1596, 1835, 1856, 2230, 2302, 3090, 4119, 4484
Hsp(7524)2	[19]	323, 413, 426, 597, 1583, 1721, 2631, 2724, 2798, 2988, 3050, 3739, 3828, 3841, 4012, 4300, 4798, 5959, 6044
HspB2	[12]	119, 190, 1751, 2158, 2791, 3532, 3607, 3989, 4192, 4822, 5067, 6008
HspH1	[8]	1596, 1835, 1856, 2230, 2302, 3090, 4119, 4484
PaeR7I	[1]	1998
Pal1	[35]	171, 202, 247, 658, 792, 828, 840, 1045, 1169, 1190, 1255, 1534, 1650, 1866, 1961, 2423, 2429, 2438, 2481, 2593, 2767, 3158, 3185, 3543, 3588, 3618, 3663, 4495, 4506, 4524, 4958, 5416, 5496, 5763, 6350
Pla1	[7]	865, 1547, 3350, 3889, 4374, 4859, 5362
PpuH1	[3]	328, 1277, 3744
Pse1	[4]	331, 1280, 3747, 6352
Pst1	[6]	987, 1163, 1888, 2511, 2738, 5618
Pvu1	[1]	5743

Pvu2	[6]	119,	190,	1751,	2791,	3532,	3607
Real	[10]	347,	478,	725,	1342,	1519,	1597,
		2991,	3893,	4288,	5853		
Rar2	[1]	3201					
Sac1	[2]	413,	3628				
Sau1	[2]	847,	1076				
SauJAI	[30]	93,	1102,	1234,	1419,	1657,	2010,
		2152,	2521,	2526,	2545,	2836,	2934,
		3024,	3102,	3505,	4019,	5046,	5121,
		5140,	5218,	5230,	5335,	5676,	5694,
		5998,	6013,	6051			
Sau96I	[29]	169,	200,	245,	260,	273,	328,
		626,	756,	826,	839,	1043,	1277,
		1532,	1649,	3201,	3541,	3586,	3616,
		3676,	3689,	3744,	4041,	5415,	5494,
		5733,	6349			5511,	
Scal	[1]	5853					
ScrF1	[42]	161,	237,	315,	473,	474,	602,
		623,	644,	789,	801,	814,	1227,
		1295,	1325,	1526,	1536,	1558,	1630,
		2251,	2268,	2689,	2849,	3072,	3578,
		3731,	3888,	3889,	4017,	4038,	4059,
		4161,	4508,	4629,	4642,	4860,	5536,
Sdul	[19]	323,	413,	426,	597,	1583,	1721,
		2631,	2724,	2798,	2988,	3050,	3739,
		3841,	4012,	4300,	4798,	5959,	6044
Sec1	[38]	159,	235,	314,	324,	472,	536,
		621,	622,	760,	799,	800,	812,
		1394,	1303,	1323,	1324,	1525,	1557,
		2194,	2266,	2389,	2424,	2433,	2482,
		3117,	3576,	3651,	3730,	3740,	3887,
		4036,	4037,	4640			3950,
SfaN1	[23]	238,	520,	997,	1657,	2107,	2239,
		2311,	2643,	2898,	2984,	3048,	3114,
		3674,	3934,	4146,	4281,	4317,	4357,
		5629,	5820,	6069		4577,	
Sfil	[1]	2435					
Sma1	[2]	474,	3889				
Spe1	[1]	726					
Sph1	[4]	1835,	2230,	2302,	3090		

Sep1	[1]	6177					
Set1	[2]	413,	3828				
Stul	[2]	1961,	2481				
Styl	[9]	324,	536,	1303,	1962,	2389,	2482,
		3117,	3740,	3950			
Taq1	[15]	860,	1096,	1407,	1418,	1660,	1999,
		2514,	2798,	2954,	2978,	3014,	3176,
		4580,	6024			3367,	
Thal	[19]	392,	394,	445,	969,	971,	1193,
		2751,	3052,	3084,	3907,	3809,	4081,
		4186,	4527,	5108,	5438,	5931,	6263
TthIII	[6]	465,	877,	1275,	2803,	3880,	4227
Xba1	[2]	1892,	3708				
Xho1	[1]	1998					
Xho2	[11]	2010,	2152,	2521,	2856,	3102,	3121,
		5132,	5218,	5230,	5998,	6015	
Xma1	[2]	472,	3887				
Xma3	[2]	790,	2591				
Xmn1	[1]	5972					
Xor2	[1]	5743					

表 4

LXSNRII2を切断しない酵素:

Acc1	Bgl2	Cla1	Epa1	Nru1
SnaB1	Bam1	Dra3	Mlu1	PflM1
Apal	BspH2	Eco47III	Mro1	Sac2
Spl1	Bst2	Bsp1	Not1	Sall
Ban1	BstB1			

表 5

1から618まで、112からの番号。

LXSNRII.12	1000	2000	3000	4000	5000	6000
NotI	1	1	1	1	1	1
NotII	1	1	1	1	1	1
NotIII	1	1	1	1	1	1
NotIV	1	1	1	1	1	1
NotV	1	1	1	1	1	1
NotVI	1	1	1	1	1	1
NotVII	1	1	1	1	1	1
NotVIII	1	1	1	1	1	1
NotIX	1	1	1	1	1	1
NotX	1	1	1	1	1	1
NotXI	1	1	1	1	1	1
NotXII	1	1	1	1	1	1
NotXIII	1	1	1	1	1	1
NotXIV	1	1	1	1	1	1
NotXV	1	1	1	1	1	1
NotXVI	1	1	1	1	1	1
NotXVII	1	1	1	1	1	1
NotXVIII	1	1	1	1	1	1
NotXIX	1	1	1	1	1	1
NotXX	1	1	1	1	1	1
NotXXI	1	1	1	1	1	1
NotXXII	1	1	1	1	1	1
NotXXIII	1	1	1	1	1	1
NotXXIV	1	1	1	1	1	1
NotXXV	1	1	1	1	1	1
NotXXVI	1	1	1	1	1	1
NotXXVII	1	1	1	1	1	1
NotXXVIII	1	1	1	1	1	1
NotXXIX	1	1	1	1	1	1
NotXXX	1	1	1	1	1	1
NotXXXI	1	1	1	1	1	1
NotXXXII	1	1	1	1	1	1
NotXXXIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXIV	1	1	1	1	1	1
NotXXXV	1	1	1	1	1	1
NotXXXVI	1	1	1	1	1	1
NotXXXVII	1	1	1	1	1	1
NotXXXVIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXIX	1	1	1	1	1	1
NotXXXX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXIV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXVI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXVII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXVIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXIX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXIV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXVI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXVII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXVIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXIX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXIV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXVI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXVII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXVIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXIX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXV	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXVIII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIX	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXI	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXII	1	1	1	1	1	1
NotXXXXXXXIII	1	1	1			

[illegible][illegible][illegible][illegible]

図6

1から4355まで、1位からの番号。

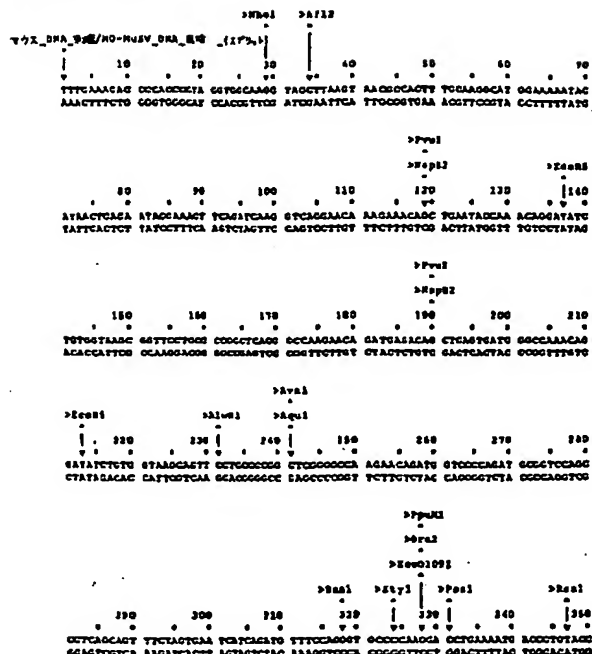


図6 (続き)

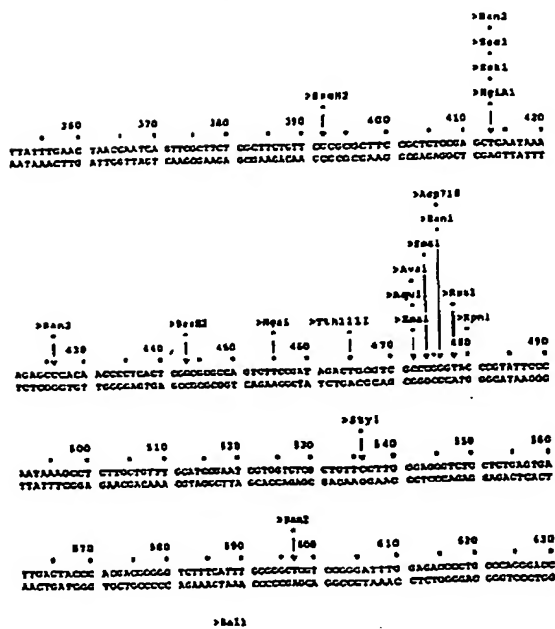
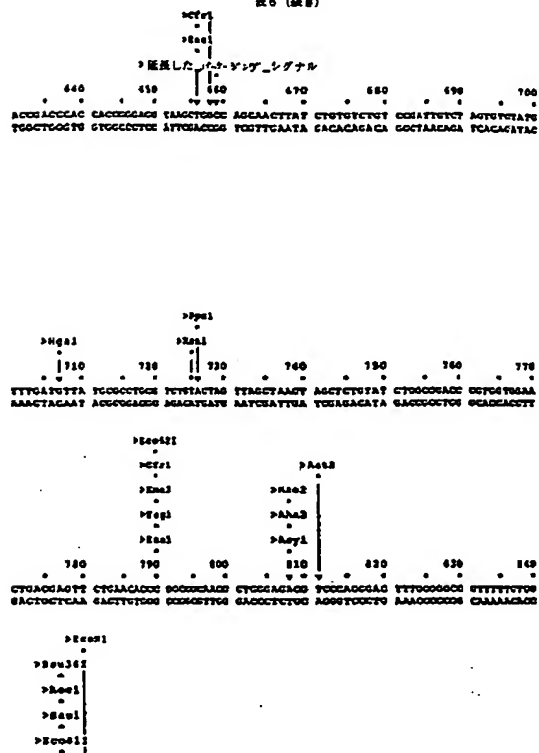


図6 (続き)



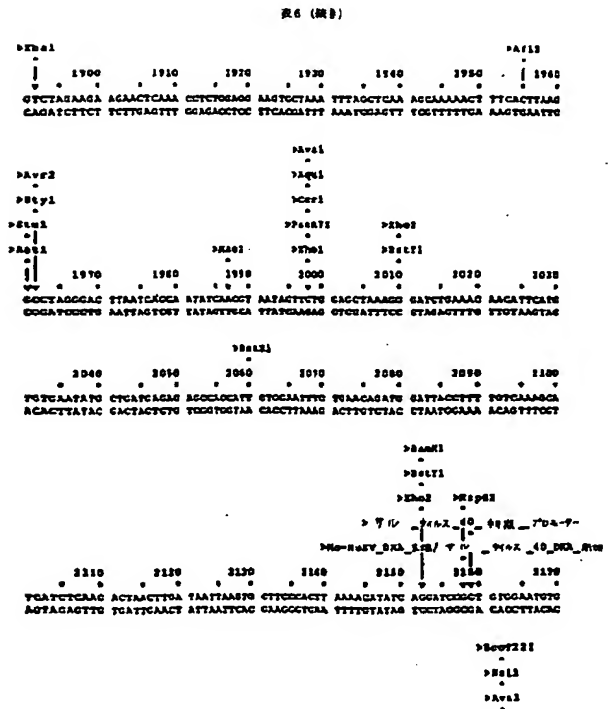
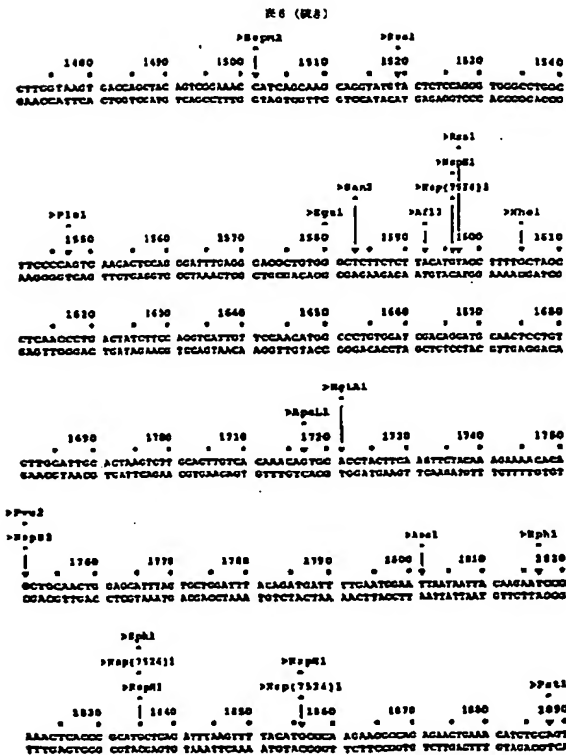
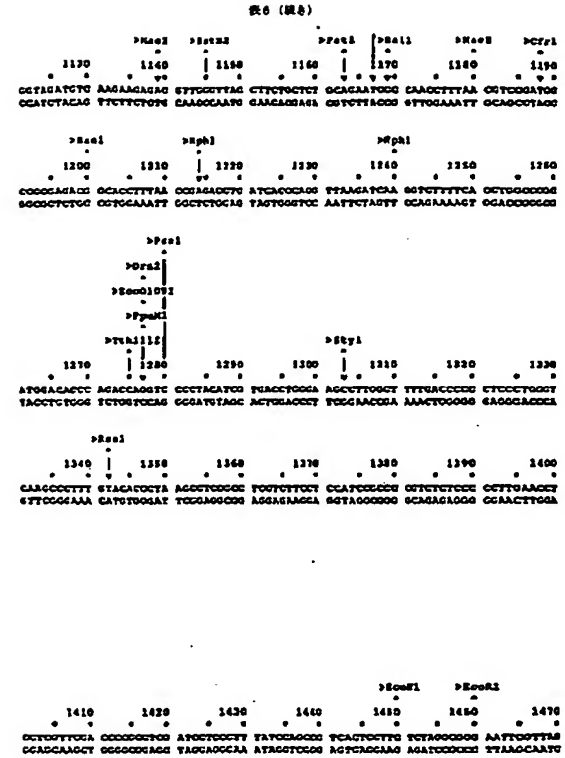
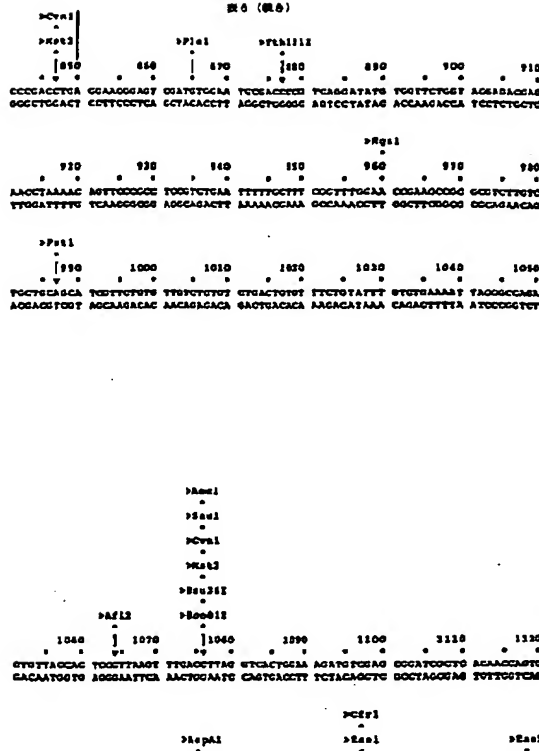
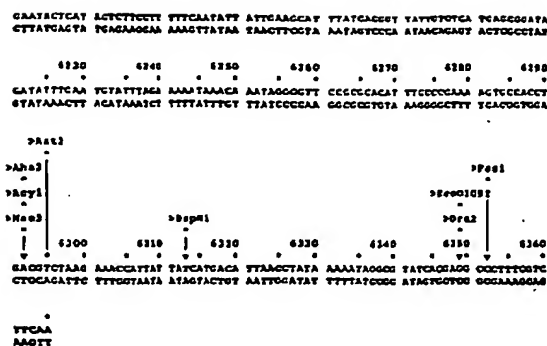


表6 (續)

LYS2811.2を切斷しない場合:

Acv3	Gcl3	Gls3	Hpa1	Hru1	Inc1
Apr1	Hmi1	Ora3	Klu1	Pflm1	Sp1
Avs2	Hupm2	Scd47112	Kru1	Sac2	Jcs3
Paa3	Hst21	Taa1	Hwi1	Gcl1	

いウイルス力価を有するコロニー ($>10^6$ 感染単位/μl) をテストした。最も高いウイルス力価を有するコロニーおよび上記の IL-3 陽現物を凍結保存した。そして、これらを L15N-R1-IL-3 レトロウイルスベクター試験を行うためのストック培養物として利用する。

案例例 11

レトロウイルスベクターの構築およびサイトカインの発現

形質導入した細胞系によるIL-2の生産を増加させるために、IL-2発現を進める異なるプロモーターを含有するベクターを用い、そしてヒトIL-2 cDNAを、インスリン分泌シグナルペプチド中に順方向にサブクローンした(17)。IL-2 cDNAを、LXSN(LTRプロモーター)およびLNCX(CNVプロモーター)ベクター(Dr. A. D. Millerより贈呈)の順方向ミッド中に順方向にサブクローンした(18)。LXSN-IL2およびLNCX-IL2と命名した新たに構築したベクター(図1)を、レトロウイルスの上清の生産のためにPA317細胞系にパッケージした。コントロールとして、高レベルの発現をする2重コピーベクターDC/TKIL-2ベクター(チミジンキナーゼプロモーター)(Dr. E. Gilboaより贈呈)を比較に用いた。

これらのベクターを、多くのマウス、ヒト、初代および樹立細胞系に用いた。形質導入した細胞のプールを選択し、そして10%ウシ胎児血清(FBS)およびネオマイシン類似体である活性G-418(400 μ g/ml)を含有するDMEM培地に展開した。HCR1およびBalb/c 3T3細胞系における発現の研究の結果を表7に

LXSN-R1-IL2レトロウイルスベクターを生成するために、10マイクログラムのpLXSN-R1-IL2 DNAを、標準的なリン酸カルシウム沈澱法(Millerら、Mol. Cell Biol. 8:2895, 1988)によって外性の(ecotropic)パッケージング細胞系PE301にトランスフェクトした。トランスフェクトしたPE301細胞系を、10% FCSを含むDMEM培地中で増殖した。培地を24時間後に交換し、そして24時間後に上清を採取し、上記のように両性の(amphotropic)パッケージング細胞系PA317に感染させた(Millerら、Mol. Cell Biol. 8:2895, 1988およびMillerら、BioTechniques 7:880, 1989)。感染PA317細胞を、トリブリン処理24時間後に採取し、そして10% FCSおよびネオマイシン類似体6418(400 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を含有するDMEM中に1:20でアブリレートした。細胞を、7% CO₂雰囲気下、37°Cで増殖した。コロニーが現れるまで選択培地を5日毎に交換した。14日目に、20コロニーを選択し、展開し、そして標準的方法(Xuら、Virology 171:331-341, 1989)によってウイルス産生物をテストした。簡単に言えば、上清を、集密(confluent)培養皿から採取し、0.45 μm のフィルターを通し、10% FCSを含むDMEMで希釈し、そして8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のポリブレン存在下でNIH 3T3を感染させるのに利用した。24時間後、NEOマイシン類似体6418を含有する培養培地中で感染NIH 3T3細胞を増殖した。12~14日後、コロニーを染色して計数し、そしてウイルスカビを上記のようにして計算した(Xuら、Virology 171:331-341, 1989)。

ノーザンブロット分析によって、IL-2発現について、最も高

示す。

表7

異なるIL-2ベクターで形質導入した線維芽細胞によるIL-2発現の比較

		<u>IL-2 の単位</u>
線維芽細胞	ベクター	／10 ⁴ 細胞／日
マウス	LNCX (コントロール)	0.4 ± 50%
	LNCX-IL2	33.7 ± 11%
	LXSN-IL2	6.6 ± 6%
	DC/TRIL-2	1.9 ± 5%
ヒト	LXSN (コントロール)	0.7 ± 29%
	LNCX-IL2	159.5 ± 17%
	LXSN-IL2	25.5 ± 15%
	DC/TRIL-2	3.0 ± 10%

(以下空白)

実施例I

レトロウイルス形質導入のための線維芽細胞培養および条件

初代線維芽細胞レトロウイルス形質導入体の培養条件を最適化した。初代線維芽細胞を前尾よく培養した。最適条件は、約4~6週間、12mm²の皮膚生検からの約1~4×10⁶個の初代線維芽細胞の増殖を可能にする。遺伝的に改変した線維芽細胞のレトロウイルス感染、G418選択、および展開は、さらに4~8週間かかる。

初代線維芽細胞の遺伝的改変の条件の探索は、最適な形質導入が以下の手順で得られ得ることを示唆する：線維芽細胞を、血清飢餓により、続いて、形質導入の18時間前に15%のウシ胎児血清を含有する培地を用いて刺激することにより、G1期に同期化する。次に細胞を、2サイクルのレトロウイルス感染させ、各サイクルを約3時間続けた。細胞を新鮮な培地で1晩再培養し、次いで翌日、G418中で選択を開始する。本方法は、感染多重度に依存して、培養物中の5~15%の線維芽細胞を形質導入し得る。

本手法を用いて、多くの初代および樹立線維芽細胞を形質導入した。例として、表8ではLXSN-IL2を用いて形質導入した線維芽細胞系におけるIL-2の発現レベルを比較する。

(以下余白)

表9

LXSN-IL2で形質導入したGT1細胞によるIL-2発現におけるG418濃度の効果。

G418の選択用量	分泌IL-2 ng/10 ⁶ 細胞/日*
25 µg/ml	1.0 ± 10%
50 µg/ml	3.0 ± 6%
100 µg/ml	15.0 ± 5%

*G418選択の3週間後。

実施例VI

末梢血液リンパ球および遺伝学的に改変された線維芽細胞によって誘起されるIL-2発現レベルの比較

遺伝学的に改変された線維芽細胞によるIL-2の生産を、インビトロで正常ヒト末梢血液リンパ球(nPBL)の刺激によって造成されたIL-2生産と比較するために、nPBLをFicol-Paque密度遠心分離によって単離し、同種系nPBL(混合リンパ球培養、MLC)、または、17nMのホルゴール 12-オステレート 13-アセテート(PMA)を加えた、2µMのカルシウムイオノホア((C11)(A23187)遊離酸)存在下で培養した。表10に示すように、本実験の結果は、PMA/CI刺激正常T細胞集団におけるIL-2発現レベルが2ng/10⁶細胞/24時間であったことを示している。

表8

LXSN-IL2で形質導入した線維芽細胞によるIL-2の発現。

線維芽細胞系	種	起源	ng IL-2 /10 ⁶ 細胞/日	IL-2の単位
Balb/c 3T3	マウス	形質転換体	6.6 ± 6%	13
MCR9	ヒト	胚	25.5 ± 15%	51
NBDF 313	ヒト	皮膚	25.0 ± 10%	50
GT1	ヒト	皮膚	15.0 ± 5%	30

これらの結果は、樹立、胚、および初代線維芽細胞培養におけるIL-2の発現レベルが類似していることを示している。表7でのこれらのデータの比較は、IL-2の発現が、使用した線維芽細胞系よりも、異なるプロモーターのような要因によって、より影響されることを示唆している。同様に、培養条件の変化は、IL-2の発現に重要な影響を及ぼし得る。表9は、形質導入したGT1細胞、すなわち初代ヒト線維芽細胞培養が、25µg/ml G418選択下よりも、100µg/ml G418選択下での方が15倍多くのIL-2を発現したことを示している。いくつかの他の初代線維芽細胞系もまた、本発明者らのベクターで形質導入され、そしてG418選択下で現在増殖している。

これは、本発明者らの最小の生産力を有するベクターである、DC/TRIL-2を用いて形質導入したBalb/c 3T3線維芽細胞によるIL-2発現レベルと等しい(表7)。MLC中でのIL-2発現レベルは130pg/10⁶細胞/24時間であった。これはPMA/CI刺激培養より低く、おそらくその理由はPMA/CIが非特異的な応答を誘起し、一方、MLCが特異的Th刺激になるからである。MLC刺激集団において、推測した抗原特異的Thの割合を考慮に入れると、刺激T細胞当たりのIL-2発現レベルは、両方法で等しくなる。

表10

異なる細胞によるIL-2分泌レベル。

細胞	分泌IL-2 pg/10 ⁶ 細胞/日
リンパ球 :	
コントロール (非活性化)	5 ± 50%
PMA + カルシウム イオノホア	2,000 ± 6%
混合リンパ球培養	130 ± 90%
形質導入線維芽細胞 :	
MCR9-LXSN-IL2	24,000 ± 5%
MCR9-INCK-IL2	162,000 ± 20%
MCR9-DC/TRIL-2	10,000 ± 6%

実施例VII

マウス腫瘍モデルにおける線維芽細胞媒介サイトカイン遺伝子治療

2つの実験のプロトコルを用いて、抗腫瘍免疫の誘導による線維芽細胞媒介サイトカイン遺伝子治療の効果を研究した。第一のプロトコルを、腫瘍移植に対する遺伝学的に改変した線維芽細胞をテストするように設計し、一方、第二のプロトコルを、全体的な抗腫瘍免疫を誘導するように設計した。各実験の結果は、2つの図および1つの表に示す。最初の図では、各処理群に対する腫瘍の増殖速度を、ある時間後の群中の平均腫瘍サイズとして示す。2番目の図では、カプラン-メ이어(Kaplan-Meier)曲線が、各処理群において個々の動物に対する腫瘍初期の時期を示す。各実験についての動物数、腫瘍のない動物の数および割合、および腫瘍サイズ分布パターンを表に示す。

実施例VII(a)

腫瘍移植における線維芽細胞媒介サイトカイン遺伝子治療の効果

3×10^4 個のCT26細胞と 3×10^5 個の異なるレトロウイルスベクターによってIL-2を発現するように遺伝学的に改変された線維芽細胞との混合物を、マウスに皮下注射した。腫瘍細胞のみ、または腫瘍細胞と未改変線維芽細胞との混合物を注射したコントロールのアームでは、33動物のうち31動物(94%)で

4週目までに腫瘍が発達した(図6および7、表9)。これとは対照的に、線維芽細胞媒介サイトカイン遺伝子治療を受けた34動物のうち32動物(94%)が、3週間まで腫瘍がなく、そして3動物(18%)は12週間後も腫瘍がなかった。これらの線維芽細胞媒介IL-2治療を受け、腫瘍が増殖した動物は、腫瘍増殖の開始および速度が遅れる特徴があった。

(以下余白)

表11
腫瘍の発生および発育に対するIL-2発現線維芽細胞の効果。
 3×10^4 個の腫瘍細胞を注射した 3×10^5 個のCT26細胞と混合した。

腫瘍細胞と混合した線維芽細胞	動物数		腫瘍の発生率 (%)	腫瘍サイズ (mm ³)					中間腫瘍サイズ (mm ³)
	全数	生存した動物数		32-100	101-200	201-300	>301		
コントロール群 (未改変線維芽細胞)	11	0	0%	1	0	1	9		470 ± 143
IL-2発現線維芽細胞	13	2	15%	1	0	1	1		318 ± 263
DC/IL-2 線維芽細胞	13	0	0%	1	1	3	4		267 ± 168
LNCX-IL2 線維芽細胞	13	5	39%	5	2	0	1		72 ± 90

・ 平均腫瘍サイズは、4週間後に、腫瘍を注射した動物の時点での値である。
 ・ この7-4での3匹のマウスは、計測し得ない腫瘍が形成された。

3週間後、マウスのコントロール群の平均腫瘍サイズ(最長および最大幅の腫瘍軸の積として測定した)は128mm²であり、これに比べて、DC/IL-2またはLNCX-IL2で形質導入した線維芽細胞と混合した腫瘍細胞を注射したマウス群では、それぞれ88および7mm²であった。これは、CT26のみまたは未改変線維芽細胞と混合したCT26で処理したマウスと比べて、IL-2処理した動物との間で高度に有意な差(補正 $\chi^2 = 18.89$, $p = 0.001$)が生じた。4週間後、同じ測定を行うと373,300および72mm²であった(表11)。最も発現性の高いベクター、LNCX-IL2は低発現性ベクターDC/IL-2よりも實質的により大きな腫瘍発生の阻害を引き起こしたことに注目し得る。腫瘍増殖の差を評価するために利用した多変量非母数統計手法(19, 20)により、4週間後、図2に示される4群に対する増殖曲線間で違いが著しく有意である($p < 0.001$)ことが証明された。続いてコントロールのアームとIL-2形質導入線維芽細胞を混合した腫瘍細胞を受けた動物との比較は、有意な差($p < 0.05$)を明らかにした。腫瘍細胞のみを注射した動物と未改変線維芽細胞を加えた腫瘍細胞を注射した動物との間の差は有意でないが、低IL-2発現線維芽細胞を受けた動物と高IL-2発現線維芽細胞を受けた動物との間の差($p = 0.05$)は有意であった。

1×10^5 個の生きている腫瘍細胞と混合した 2×10^5 個の改変線維芽細胞をマウスに注射すると、結果はより著しいものとなった(図8および9、および表12を参照のこと)。4週間後、全てのコントロール動物で腫瘍が発達したのに対し、

DCTK-IL2またはLXSN-IL2ベクターで改変した線維芽細胞で処
理した動物のそれぞれ33%および27%では、7週間後も腫瘍が
ないままである(実験は継続中)。さらに劇的なことに、最
高IL-2生産ベクターであるLSCX-IL2ベクターで改変した線維
芽細胞で処理した動物の75%は、7週間後も腫瘍が発生しない
ままである。これらのデータは、明らかに腫瘍の定着を防ぐ
ためのIL-2の初期大量投与の重要性を証明する。

(以下余白)

表11.2
腫瘍の定着および発症に対するIL-2改変線維芽細胞の効果
1×10⁶個の線維芽細胞を注射時に1×10⁶個のDCTK-IL2改変細胞と混合した。

処置細胞と混合 した細胞の種類	動物数		腫瘍の パーセント	腫瘍サイズ (mm ²)				平均腫瘍サイズ (mm ²)
	全数	腫瘍あり		25-100	101-200	201-300	>300	
① 22週目後*								
コントロール (DCTK-IL2改変細胞なし)	13	0	15	0	5	2	5	315 ± 187
未改変線維芽細胞**	20	0	20	0	2	3	14	350 ± 100
DCTK-IL2改変細胞	13	4	31	0	1	4	3	165 ± 141
LXSN-IL2改変細胞**	15	4	27	0	5	1	3	133 ± 121
LNCX-IL2改変細胞	3	6	75	2	0	0	0	8 ± 14

* 平均腫瘍サイズは、4週間後に、腫瘍を計測した最後の時点での値である。
** これらのデータは、それぞれ1匹のマウスは、計測し得ない腹腔内腫瘍が検出された。
*** この下への3匹のマウスは、計測し得ない腹腔内腫瘍が検出された。

追加のコントロールとして、遺伝学的にIL-2を発現するよ
うに改変したCT26細胞をマウスに注射した(結果は示してい
ない)。1×10⁶個に達するまでのIL-2発現腫瘍細胞のBalb/c
マウスへの注射では、腫瘍を生成しなかった。しかしながら、
さらに多くの注射では、数匹の動物が腫瘍発生の遅れを伴っ
て腫瘍が発生した。これらのデータは、文献(1)に報告されて
いる結果を確認する。IL-2生産線維芽細胞の効果とIL-2生産
腫瘍細胞とを比較するために、本発明者らは、DCTK-IL2ベ
クターで改変した1×10⁶個のCT26腫瘍細胞と1×10⁶個の未改変
腫瘍細胞とを混合した。図10および11、および表13は、
DCTK-IL2改変腫瘍細胞が、腫瘍発生を防ぐのにいくぶん有効
であることを示している。注射の4週間後、処理したアーム
の平均腫瘍サイズは103mm²であり、これに比べてコントロール
のアームでは120mm²である。22週間後、1匹の動物(10%)
が腫瘍がないままであるが、これに比べてコントロールのア
ームでは腫瘍がないものはない。別々の実験において、同じ
条件下でDCTK-IL2改変腫瘍細胞で処理した動物に対するデー
タを、比較の目的で含有する。この比較は、DCTK-IL2改変腫
瘍細胞が、DCTK-IL2改変線維芽細胞と同様の腫瘍定着に対す
る効果を有することを示唆する。

(以下余白)

表11.3
腫瘍の定着および発症に対するIL-2改変線維芽細胞の効果
1×10⁶個のCT26細胞と混合した1×10⁶個のDCTK-IL2改変細胞と1×10⁶個のCT26改変細胞と混合した1×10⁶個のDCTK-IL2改変細胞とを比較した。

処置細胞と混合 した細胞の種類	動物数		腫瘍の パーセント	腫瘍サイズ (mm ²)				平均腫瘍サイズ (mm ²)
	全数	腫瘍あり		25-100	101-200	201-300	>300	
① 22週目後*								
コントロール (DCTK-IL2改変細胞なし)	5	0	5	0	0	0	5	620 ± 198
未改変線維芽細胞	5	0	5	0	0	0	5	517 ± 69
DCTK-IL2改変細胞	10	1	10	1	0	2	5	303 ± 179
DCTK-IL2改変細胞	3	2	25	0	1	2	3	214 ± 153

* 平均腫瘍サイズは、4週間後に、腫瘍を計測した最後の時点での値である。

変換例VII(b)

全身的抗腫瘍免疫に対する腫瘍芽細胞媒介サイトカイン遺伝子治療の効果

Balb/cマウス群を、 2.5×10^5 個の放射線照射した腫瘍細胞の単独で、あるいは 1×10^5 個の形質導入または未変換腫瘍細胞と混合した腫瘍細胞で免疫し、1週間後、反対の側腹に 5×10^4 個の生きた腫瘍細胞で抗原投与した。これらの結果（図12および13、および表14）は、放射線照射した腫瘍細胞および形質導入腫瘍細胞を用いた免疫化は、動物を生きた腫瘍細胞の抗原投与に対して防御するが、その防御は、放射線照射した腫瘍細胞単独または未変換腫瘍細胞と混合した放射線照射した腫瘍細胞での免疫化により達成した防御よりわずかによいのみであることを証明する。

(以下余白)

表14

全身的抗腫瘍免疫の誘導に対するIL2変換腫瘍芽細胞の効果
マウスは、 5×10^4 個の放射線照射した腫瘍細胞で免疫化する7日前に、 1.5×10^4 個の放射線照射した腫瘍細胞と混合した 1×10^5 個の形質導入腫瘍細胞で免疫した。

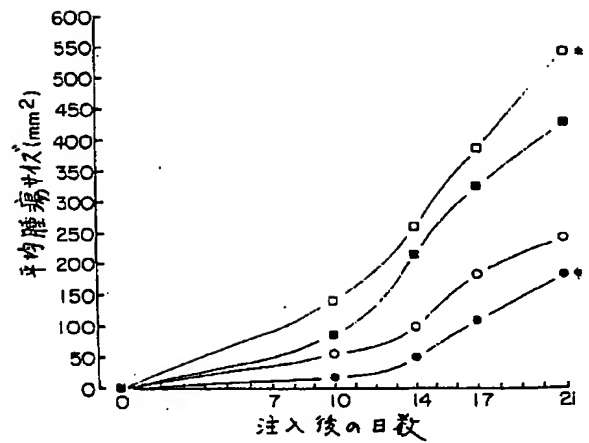
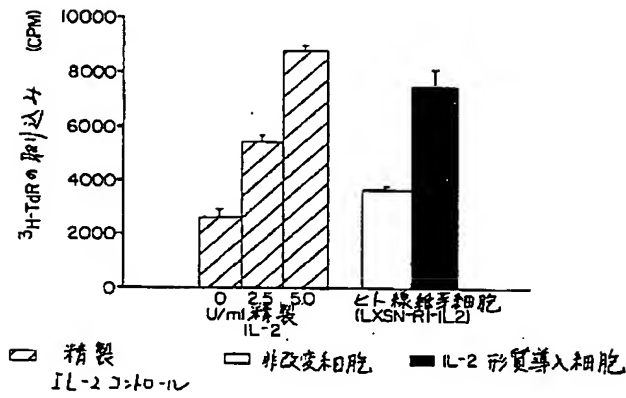
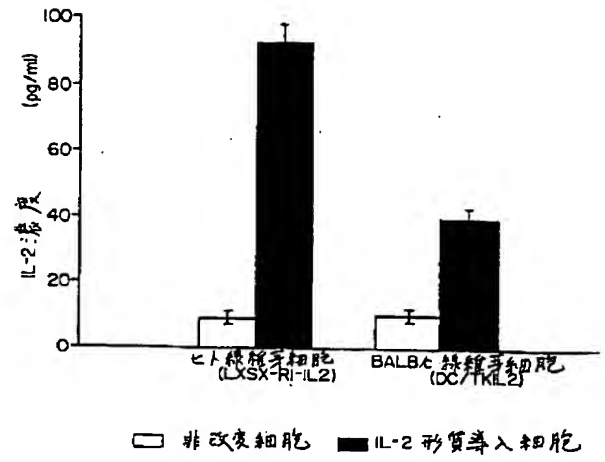
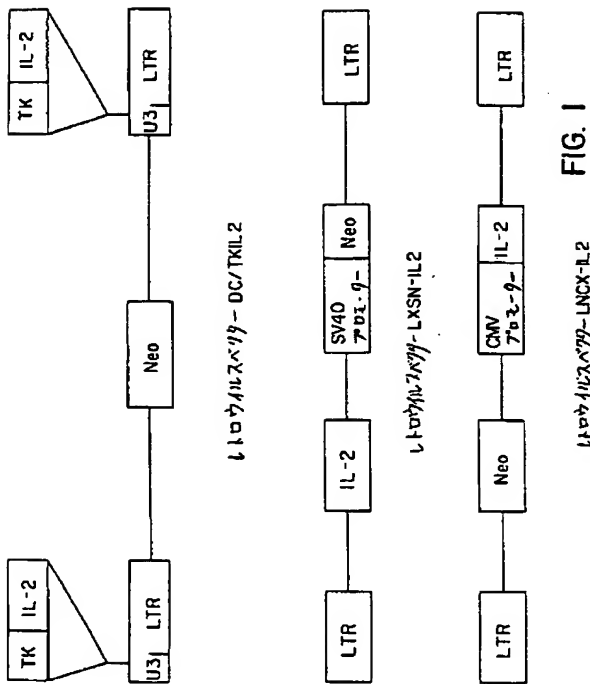
放射線照射腫瘍細胞と混合した腫瘍細胞	動物数		腫瘍サイズ (mm ²)				平均腫瘍サイズ (mm ²)	
	全数	腫瘍なし (割合あり)	腫瘍なしのパーセント	25-100	101-200	201-300 > 301		
22匹動物*	20	0	20	0	0	1	19	574 ± 160
	16	5	11	31	2	1	3	259 ± 277
	15	4	11	27	0	1	3	266 ± 199
	23	10	15	40	4	1	8	177 ± 194

* 平均腫瘍サイズは、4週間後に、腫瘍を計測した時点での値である。
** これらのマウスは、計測し得ない腫瘍内腫瘍が形成した。

上記のプロトコールと類似の第二のプロトコールにおいて、動物を、腫瘍細胞と混合した放射線照射した腫瘍細胞で免疫化し、2週間後、新鮮な腫瘍細胞で抗原投与した。図14および15、および表15に示すように、その結果は、放射線照射した腫瘍細胞と混合したDCTX-IL2変換腫瘍細胞が、放射線照射腫瘍細胞単独、未変換腫瘍細胞と混合した放射線照射腫瘍細胞、またはLNCX変換腫瘍細胞と混合した放射線照射腫瘍細胞よりも、続いて起こる腫瘍の抗原投与に対して優れた防御をもたらすことを証明する。7週間後、コントロール動物の3分の1に比較して、DCTX-IL2変換腫瘍細胞で処理した10動物のうち7匹(70%)で腫瘍がないままである。4週間目、平均腫瘍サイズが、3つのコントロール群で180、170、および140mm²であるのに比較して、この群では41mm²であった。LNCX-IL2変換腫瘍細胞で処理した動物もまた、次の腫瘍細胞の抗原投与に対して防御されたが、結果はそれほど著しいものではなかった。この群において、54%の動物が腫瘍がないまま残っており、そして、4週間目のこの群の平均腫瘍サイズは88mm²であった。LXSN-IL2変換腫瘍細胞で処理した群中の腫瘍がない動物数は、その腫瘍が、その開始において若干遅れたが、コントロール群と同様であった。腫瘍の開始における違いを評価するのに利用した多変量非母数統計手法(19,20)により、図15に示す6匹のアームについての違いは有意($p=0.012$)であることが証明された。それは、さらに生理食塩水で処理したコントロールのアーム、および放射

線照射腫瘍細胞単独、あるいは、未変換またはLNCXベクター変換腫瘍細胞と混合した放射線照射腫瘍細胞を受けたアームが、統計的な群を形成したことを示した。放射線照射腫瘍細胞と混合したIL-2ベクター変換腫瘍細胞を受けた8匹のアームにより、第二の異なる統計的な群を形成した。生理食塩水を注射したコントロールアームとIL2形質導入腫瘍細胞を混合した腫瘍細胞を受けた動物との間の以下の比較は、全てのベクターについて有意な差を示した($p<0.05$)。

(以下余白)





1 2 3 4 5 6 7

FIG. 5

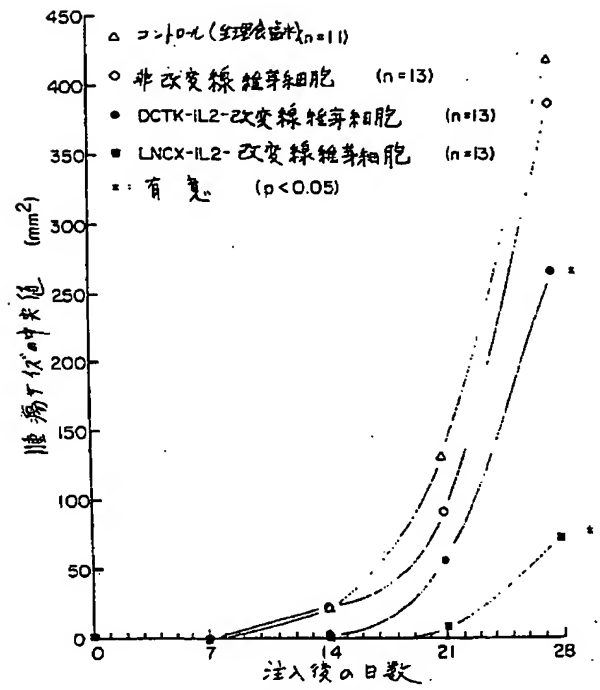


FIG. 6

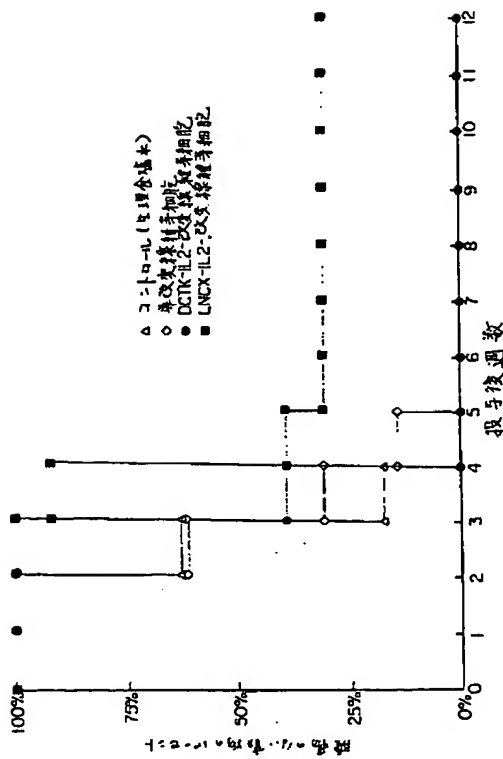


FIG. 7

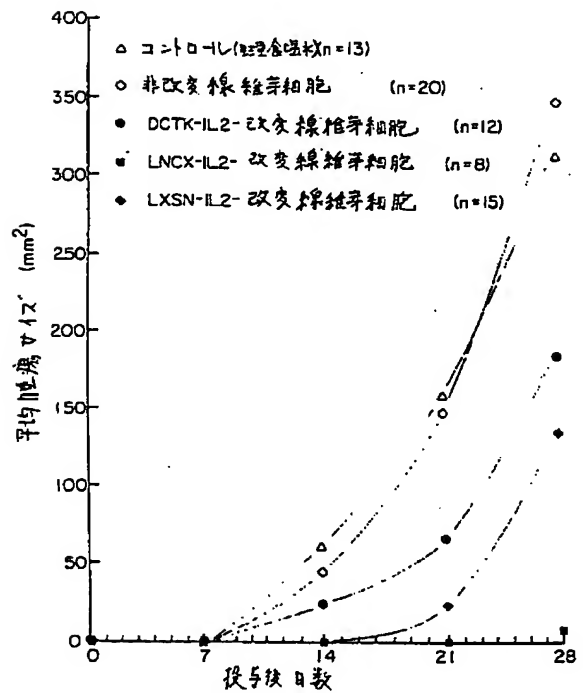
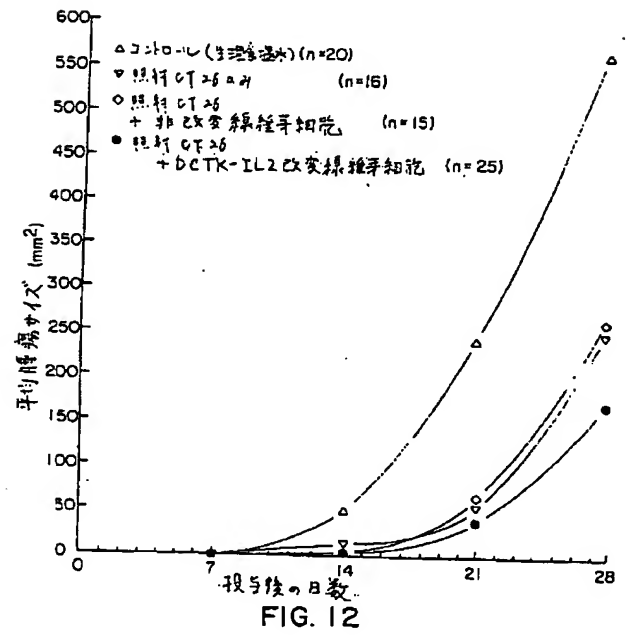
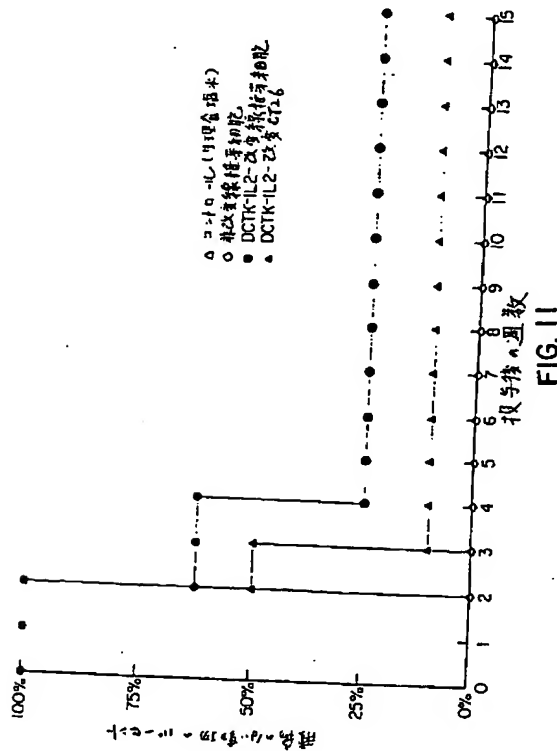
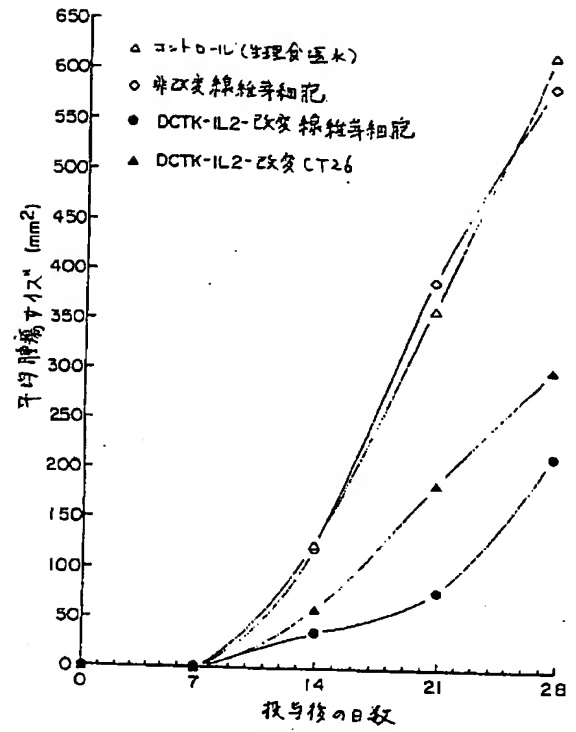
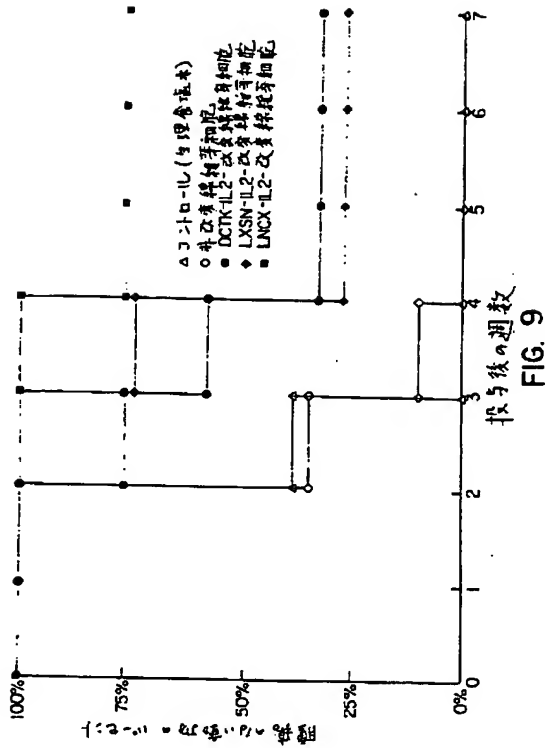
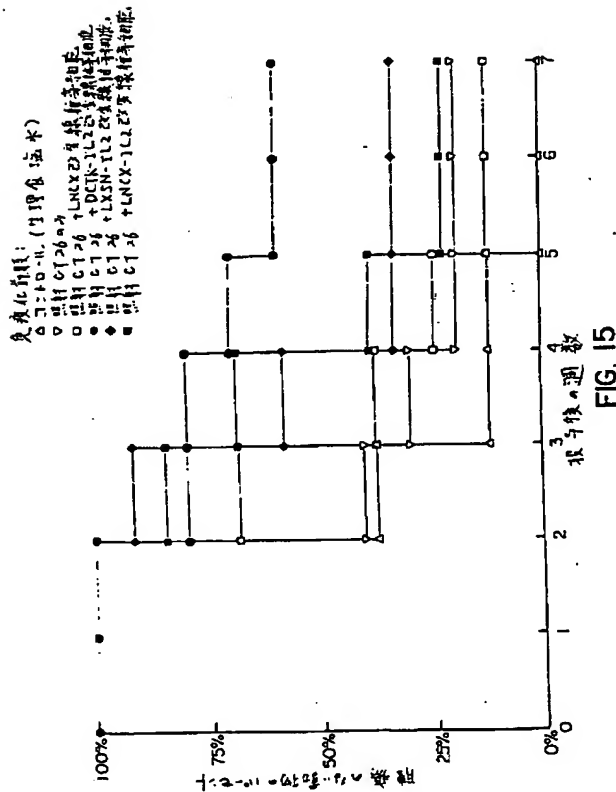
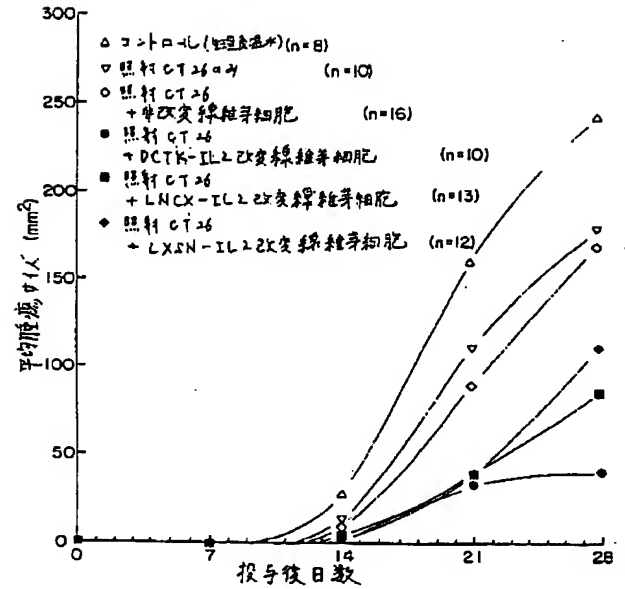
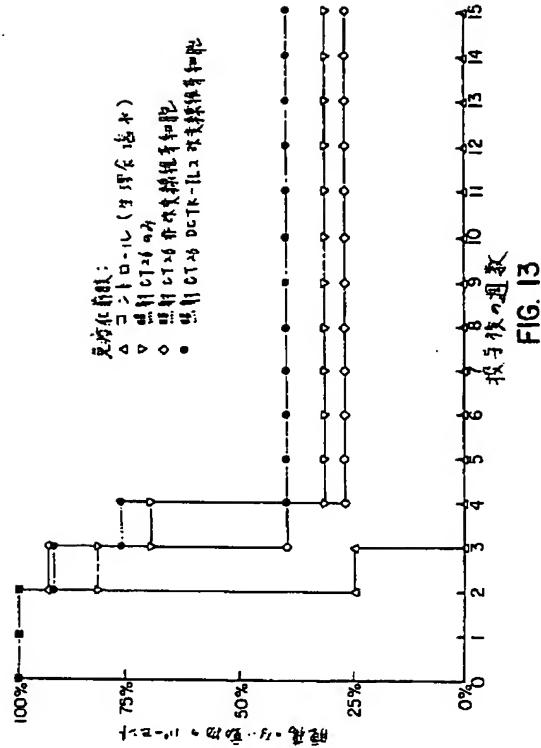


FIG. 8





補正書の写し (翻訳文) 提出書 (特許法第184条の8)

平成8年4月25日

特許庁長官殿

1. 特許出願の表示

PCT/US92/08999

2. 発明の名称

癌のリンホカイン遺伝子療法、

3. 特許出願人

住所 アメリカ合衆国 カリフォルニア 92121, サン ディエゴ,
スイート 200, サイエンス パーク ロード 3099

名称 サン ディエゴ リージョナル キャンサー センター

4. 代理人

住所 〒540 大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号

クリスタルタワー15階

氏名 (7828) 弁護士 山本秀雄

電話 (大阪) 06-949-3910

5. 補正書の提出年月日

1998年11月29日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の写し (翻訳文)

1通



請求の範囲

1. 該腫瘍体の癌を処置する方法であって、腫瘍性抗原、および、サイトカイン遺伝子産物を発現するように遺伝的に改変されたサイトカイン発現細胞を含有する製剤形態で、活動中の腫瘍部位以外の部位において、該腫瘍体を免疫処置することにより、癌に対する該腫瘍体の免疫応答を刺激する工程を包含し、ここで、該サイトカイン発現細胞が腫瘍細胞ではない、方法。

2. 前記細胞体からあらかじめ単離された腫瘍細胞が、前記腫瘍性抗原を供給する、請求項1に記載の方法。

3. 前記サイトカイン遺伝子が、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-3、インターロイキン-4、インターロイキン-5、インターロイキン-6、およびグマインタンパクフェロンからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

4. 前記サイトカイン遺伝子が、インターロイキン-2である、請求項1に記載の方法。

5. サイトカイン発現細胞を生成するために、サイトカイン遺伝子が組換え法により細胞中に転移される、請求項1に記載の方法。

6. 前記サイトカイン遺伝子が、発現ベクター中に存在する、請求項5に記載の方法。

7. 前記発現ベクターが、自殺遺伝子をさらに含有する、

インターロイキン-2、インターロイキン-3、インターロイキン-4、インターロイキン-5、インターロイキン-6、およびガンマインターフェロンからなる群から選択される、請求項1)に記載の組成物。

13. 前記サイトカイン遺伝子が、インターロイキン-2である、請求項11に記載の組成物。

14. 前記サイトカイン遺伝子が、免疫応答を刺激するのに十分であるが、実質的な全身的毒性を避けるのには十分に低いレベルで発現される、請求項11に記載の組成物。

15. 前記形質導入の工程において、前記レトロウィルス発現ベクターが、11-2の持続分泌を引き起こすプロモーターを有する、請求項9に記載の方法。

18. 前記レトロウイルス発現ベクターが、1日につき10⁸個の細胞当たり約2ナノグラムから約150ナノグラムのIL-2の分泌を引き起こす、請求項15に記載の方法。

請求項 6 に記載の方法。

8. 前記サイトカイン発現細胞が、線維芽細胞および抗原提示細胞から生産される、請求項5に記載の方法。

9. 癌に対する被験体の免疫応答を高める方法であって;

4) 該被験体から線維芽細胞を単離する工程；

b) インビトロで、該線維芽細胞を培養する工程；

c) レトロウイルス発現ベクター中に、IL-2をコードする遺伝子および腫瘍性抗原をコードする遺伝子を含むレトロウイルス発現ベクターを用いて、該線維芽細胞を形質導入して、該線維芽細胞により、該腫瘍性抗原を発現し、そして、該IL-2を発現および分泌する工程：および

d) 活性腫瘍部位以外の部位において、免疫応答を高めるのに十分であるが、實質的な全身的毒性を避けるのに十分に低いレベルでIL-2を発現し、そして該腫瘍性抗原を発現する該線維芽細胞を用いて、該被験体を免疫処置する工程、を包含する、方法。

10. 前記線維芽細胞が、自殺遺伝子を発現するように、さらに改変される、請求項目に記載の方法。

1. 腫瘍性抗原に対する被験体の免疫応答を高める組成物であって、該組成物が、腫瘍性抗原、および、サイトカイン遺伝子産物を発現するように遺伝的に改変されたサイトカイン発現細胞を含有し、ここで、該サイトカイン発現細胞が腫瘍細胞ではない、組成物。

12. 前記サイトカイン遺伝子が、インターロイキン-1、

[illegible]

国際調査報告		International Application No. PCT/US85/0999
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
2 Y	Carter, Kenneth, Volume 20, issued 13 December 1990, Constituting at 61, "Recovered Video-taped Interview One Tractor One Tractor C40 Operator Pomeroy and Long Landing Ambulance Ambulance", pages 7822-7823, see the entire document.	1, 3, 5, 6, 11, 12, 13 2, 7

Form PCT/ISA/210 (Continuation of annual sheet/July 1992a)

国際調査報告		International Application No. PCT/US85/0999
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC Cl:		
A61K 48/00, 28/12, 36/00, C12N 1/79, 1/24, 1/23, 1/25, 1/19, 1/10		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER: US Cl :		
436/938, 939, 940, 435/242.2, 930.1, 99.3, 99.31, 99.32, 925/63, 32, 11, 27, 78, 71		

Form PCT/ISA/210 (Continuation of annual sheet/July 1992a)

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁴

// A 6 1 K 38/00

38/21

識別記号 庁内整理番号

F I

(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, SE), CA, JP

(72) 発明者 ロイストン, アイバー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037,
ラ ホヤ, エル カミノ デル テアトロ
1515

(72) 発明者 フリードマン, シオドア
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037,
ラ ホヤ, ラ ホヤ ショアーズ ドライ
ブ 9470

(72) 発明者 ファクライ, ハビーブ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92056,
オーシャンサイド, アベニダ アンダンテ
1538

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成12年3月14日(2000.3.14)

【公表番号】特表平7-503455

【公表日】平成7年4月13日(1995.4.13)

【年通号数】

【出願番号】特願平5-507903

【国際特許分類第7版】

A61K 35/12 ADU

31/70

48/00

// A61K 38/00

38/21

【F I】

A61K 35/12 ADU

31/70

48/00

37/02

37/66

平続補正書

平成11年10月13日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

平成5年特許第507903号

2. 補正をする者

住所 アメリカ合衆国 カリフォルニア 92121, サン ディエゴ,

スイート 200, サイエンス パーク ロード 3099

名称 サン ディエゴ リージョナル キャンサー センター

3. 代理人

住所 〒640-6015 大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号

クリスタルタワー15階

氏名 (7828) 弁理士 山本 秀康

電話(大阪) 06-6949-3910

4. 補正対象書類名

請求の範囲および明細書

5. 補正対象項目名

請求の範囲および明細書

6. 補正の概要

6.1 請求の範囲を別紙のとおり補正します。

6.2 明細書を以下のとおり補正します。

6.2.1 明細書第45頁〜第50頁に記載の表5を削除します。

請求の範囲

1. 腫瘍性抗原に対する細胞体の免疫応答を高める組成物であって、該組成物が、腫瘍性抗原、および、少なくとも1種のサイトカイン遺伝子産物を発現するように遺伝的に改変されたサイトカイン発現細胞(CD細胞)を含有する、組成物。

2. 前記サイトカイン遺伝子が、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-3、インターロイキン-4、インターロイキン-5、インターロイキン-6、およびガンマインターフェロンからなる群から選択される、請求項1に記載の組成物。

3. 少なくとも1種のサイトカイン遺伝子が、インターロイキン-2である、請求項1に記載の組成物。

4. 各サイトカイン遺伝子が、免疫応答を刺激するのに十分であるが、実質的な全身的毒性を避けるのにには十分に低いレベルで発現される、請求項1に記載の組成物。

5. 腫瘍細胞が、前記腫瘍性抗原を提供する、請求項1に記載の組成物。

6. 前記サイトカイン遺伝子産物が、腫瘍ベクターから発現される、請求項1に記載の組成物。

7. 前記腫瘍ベクターが、自殺遺伝子を含有する、請求項6に記載の組成物。

8. 前記CD細胞が、幹細胞系細胞から生産される、請求項1に記載の組成物。

9. 前記CD細胞が、抗腫瘍細胞系細胞から生産される、請求項1に記載の組成物。

10. 癌の治療として癌細胞の免疫応答を刺激する薬物の調製における、請求項1から9のいずれか1項に記載の組成物の使用。

11. 癌に対する癌細胞の免疫応答を刺激するための薬物として使用するための組成物の調製方法であって、

- a) 癌細胞から癌細胞膜を分離する工程；
- b) インビトロで、癌細胞膜を培養する工程；
- c) インターロイキン-2をコードする遺伝子を含有するレトロウイルス発現ベクターを用いて、癌細胞膜を形質導入して、C.E.細胞を誘発する工程；
- d) 癌細胞から癌細胞膜を分離する工程；
- e) 癌細胞膜の単細胞膜を調製する工程；
- f) 癌細胞膜が増殖する能力を阻害する薬物を用いて、癌細胞膜を処理する工程；および
- g) 癌C.E.細胞および癌細胞膜を含有する組成物を処方する工程、を含む、方法。

12. 前記レトロウイルス発現ベクターが、自殺遺伝子を含有する、請求項11に記載の方法。

13. 前記レトロウイルス発現ベクターが、インターロイキン-2の持続分泌を引き起こすプロモーターを含有する、請求項11に記載の方法。

14. 前記レトロウイルス発現ベクターが、少なくとも4単位/日のインターロイキン-2の分泌を引き起こす、請求項11に記載の方法。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.